

**Leicht polarisierbare Wasserstoffbrücken
und Protontransfer in Assoziaten von
Poly- α -Aminosäuren und Monomeren**

— Eine infrarotspektroskopische Untersuchung —

Rainald Lindemann

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554614_0032

Leicht polarisierbare Wasserstoffbrücken
und Protontransfer in Assoziaten von
Poly- α -Aminosäuren und Monomeren
- Eine infrarotspektroskopische Untersuchung -

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades des
Fachbereiches Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Rainald Lindemann
München
1976

1. Berichterstatter: Prof.Dr.G.Zundel

2. Berichterstatter: Prof.Dr.G.Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 23.2.1976



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Oktober 1971 bis November 1975 im Institut für Physikalische Chemie der Universität München durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Georg Zundel,

der das Thema dieser Arbeit anregte, möchte ich besonders herzlich für die wertvollen Diskussionen und sein großzügiges Entgegenkommen bei der Durchführung dieser Arbeit danken.

Herrn A.Röhrich danke ich für die rasche Beschaffung der Chemikalien und den Herren F.Reim und E.Rupp für die Durchführung feinmechanischer Arbeiten.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Förderung.

Inhalt

	Seite
Einleitung	1
Teil A: Assoziat von Carbonsäuren und N-Basen	4
1. <u>Zusammenstellung der Systeme und IR-Spektrentabelle</u>	4
2. <u>Experimentelles</u>	5
2.1. Die Substanzen	5
2.2. Herstellung der Mischungen	6
2.3. Dichtemessung	6
2.4. Flüssigkeitsküvette	7
2.5. Aufnahme der Spektren	9
2.6. Auswertung der Spektren, Korrekturfaktor f	9
3. <u>Protontransfer in Abhängigkeit vom ΔpK_a</u>	11
3.1. COOH- und CO_2^- -Banden im Bereich $2000 - 1000 \text{ cm}^{-1}$	11
3.2. Protontransfer	18
3.2.1. Die $\nu\text{C=O}$ -Bande als Maß für den Protontransfer	18
3.2.2. Zusätzliche Auswertung der CO_2^- -Banden	19
3.2.3. Ergebnisse und Diskussion	20
3.3. Weitere Bandenänderungen bei den Säuremolekülen	23
3.4. Veränderungen an den Banden der Basen	24
3.5. Banden der Gruppen in den Wasserstoffbrücken im Bereich $3500 - 1700 \text{ cm}^{-1}$	26
4. <u>Protontransfer in Abhängigkeit von der Wasserzugabe</u>	28
4.1. Essigsäure + Pyridin + $n \text{ H}_2\text{O}$	29
4.2. Essigsäure + Imidazol + $n \text{ H}_2\text{O}$	32
4.3. Veränderungen an den Banden der Basen	35
4.4. Die übrigen Systeme mit 4 Molekülen H_2O pro Assoziat	37
4.5. Banden der Gruppen in den Wasserstoffbrücken im Bereich $3500 - 1700 \text{ cm}^{-1}$	42

	Seite
4.6.	Wasserbanden 43
4.7.	Erhöhung des Protontransfers durch Wasserzugabe 45
5.	<u>Kontinuierliche Absorption</u> 47
5.1.	Grundlagen 47
5.2.	Kontinuierliche Absorption in den wasserfreien Systemen 48
5.3.	Einfluß des Wassers. Kontinuumsextinktion und Dissoziation 51
5.3.1.	Kontinuum in Abhängigkeit von der Wasserzugabe 51
5.3.2.	Kontinuum in den Mischungen mit 4 Molekülen H_2O pro Assoziat 53
5.4.	Gibt es andere Assoziate, die das Kontinuum verursachen? 55
5.5.	Kontinuum und ABC-Banden 55
Teil B: Assoziate von Poly-L-Glutaminsäure mit N-Basen und Poly-L-Histidin mit Carbonsäuren	
6.	<u>Zusammenstellung der Systeme und IR-Spektrentabelle</u> 56
7.	<u>Experimentelles</u> 57
7.1.	Substanzen 57
7.2.	Herstellung der Filme 58
7.3.	Küvetten zur Aufnahme der Filmspektren 59
7.4.	Hydratation und Deuterierung 62
7.5.	Vorgehen bei flüchtigen Säuren und Basen 62
7.5.1.	Einstellung des Säuren- oder Basengehalts der Filme 63
7.5.1.1.	Strömungsmethode 63
7.5.1.2.	Variation des Dampfdrucks mit Mischungsverhältnis und Temperatur 64
7.5.1.3.	Kondensation auf die Filme 65
7.5.2.	Kontrolle der Anwesenheit von Säure und Base 66
7.5.2.1.	Potentiometrische Titration 66
7.5.2.2.	UV-Banden 67

	Seite
7.6.	Messungen in Lösung 67
7.7.	Aufnahme der Spektren 68
7.7.1.	Vergleichsküvetten 69
7.7.2.	Streuung an den Filmoberflächen 69
8.	<u>Weitere Vorarbeiten: Sorptionswägungen an Polyaminosäurefilmen</u> 69
8.1.	Bau einer Adsorptionswaage 70
8.2.	Trägerfreie Probefilme 71
8.3.	Geschwindigkeiten der Sorption von H_2O 71
8.4.	Sorptionsisotherme beim Na-Salz von PLG 74
8.5.	Adsorption flüchtiger Säuren und Basen 75
9.	<u>PLG und das Na-Salz</u> 77
9.1.	Amidbanden und Sekundärstruktur 78
9.1.1.	Amid I- und II-Banden 78
9.1.2.	Amid A- und B-Banden 83
9.1.3.	Amid III-, IV- und V-Banden 84
9.1.4.	Aufspaltung der $\nu_{as}CH_2$ -Bande bei Ausbildung der β -Struktur 84
9.2.	Banden der Säuregruppe bei PLG 85
9.3.	Banden der Carboxylatgruppe beim Na-Salz 85
10.	<u>Abhängigkeit des Protontransfers vom ΔpK_a bei Assoziaten von PLG mit N-Basen</u> 86
10.1.	Amidbanden und Sekundärstruktur 86
10.1.1.	Amid I- und II-Banden 86
10.1.2.	Amid A- und B-Banden 89
10.1.3.	Amid III- und Amid V-Banden 90
10.1.4.	Aufspaltung der $\nu_{as}CH_2$ -Bande bei Ausbildung der β -Struktur 90
10.2.	Diskussion des Protontransfers an Hand der Carboxylbanden 90
10.2.1.	PLG - n-Propylamin 92
10.2.2.	PLG - Picolylamin 93
10.2.3.	PLG - 2-Äthylimidazol, PLG - Imidazol und PLG - 3-Aminopyridin 93
10.2.4.	PLG - Pyridin 94
10.3.	Quantitative Bestimmung des Protontransfers 94
10.4.	Veränderungen an den Banden der Basen 97

	Seite
10.5. Absorptionen der Gruppen in den Wasserstoffbrücken im Bereich $3500 - 1700 \text{ cm}^{-1}$	98
11. <u>Abhängigkeit des Protontransfers von der Hydratation in den PLG - Base-Assoziaten</u>	99
11.1. PLG - Imidazol + n H_2O	100
11.1.1. COOH- und CO_2^- -Banden und Protontransfer	100
11.1.2. Banden des angelagerten Wassers und Art der Wasseranlagerung	103
11.1.3. Veränderungen an den Banden des Imidazols	104
11.1.4. Absorptionen der Gruppen in den Wasserstoffbrücken im Bereich $3500 - 1700 \text{ cm}^{-1}$	104
11.2. COOH- und CO_2^- -Banden und Protontransfer in den anderen PLG - N-Base-Assoziaten	105
11.3. Reversible hydratationsabhängige Strukturumwandlung bei PLG - n-Propylamin	109
11.4. Amidbanden und Sekundärstruktur in den anderen PLG - N-Base-Systemen bei Hydratation	110
11.5. Protontransfer, Hydratation und Konformation	111
12. <u>PLH und das Hydrochlorid</u>	112
13. <u>Abhängigkeit des Protontransfers vom ΔpK_a bei Assoziaten von PLH mit Carbonsäuren</u>	116
13.1. Amidbanden und Sekundärstruktur	116
13.2. COOH- und CO_2^- -Banden der Carbonsäuren und Protontransfer	119
13.3. Quantitative Bestimmung des Protontransfers	122
13.4. Banden des Histidinrests	124
13.5. Absorptionen der Gruppen in den Wasserstoffbrücken	125
14. <u>Abhängigkeit des Protontransfers von der Hydratation in den PLH-Carbonsäure-Systemen</u>	127
14.1. PLH-Essigsäure + n H_2O	128
14.1.1. COOH- und CO_2^- -Banden und Protontransfer	129
14.1.2. Einige Banden des Histidinrests	131
14.1.3. Absorptionen der Gruppen in den Wasserstoffbrücken	132
14.1.4. Banden des angelagerten Wassers	132

14.2.	PLH - Ameisensäure + n H ₂ O	132
14.3.	Die anderen Systeme	135
14.4.	Assoziate mit schwerflüchtigen Carbonsäuren	136
14.5.	Amidbanden und Sekundärstruktur	137
14.5.1.	PLH - Essigsäure + n H ₂ O	137
14.5.2.	PLH - Ameisensäure + n H ₂ O	139
14.5.3.	Amidbanden und Sekundärstruktur in den anderen Systemen	140
14.6.	Hydratation, Protontransfer und Sekundär- struktur	141
14.7.	PLH-Filme aus Carbonsäureüberschuß. Kopplung von Protontransfer an die Konformation	142

Einleitung

Es liegen mehrere Arbeiten vor über eine Wasserstoffbrückenwechselwirkung zwischen Histidin- und Carboxylresten in Proteinen. Die Existenz von derartigen Brücken wird insbesondere durch Röntgenstrukturuntersuchungen bestätigt. Danach gibt es solche Wechselwirkungen im Hämoglobin (1) und im aktiven Zentrum mehrerer Proteasen (2)-(2d). Auch mit anderen physikalisch-chemischen Methoden wurden solche Wasserstoffbrücken in Proteinen untersucht, so z.B. mit NMR im Fall der RNase T₁ (3)-(3b).

Diese Wasserstoffbrücken sind deshalb so interessant, weil sie weitgehend symmetrisch sein können. Im Fall eines etwa symmetrischen Potentials kann das Proton leicht zwischen saurer und basischer Gruppe übertreten, die Brücken sind dann leicht polarisierbar. Wenn man die Umgebung solcher Wasserstoffbrücken in relativ geringem Ausmaß verändert, kann man einen wesentlichen Einfluß auf den Protontransfer in diesen Brücken erwarten. Diese Möglichkeiten legen die Vermutung nahe, daß die Histidin-Carboxyl-Brücken an Regulierungsmechanismen wie dem Bohreffekt beim Hämoglobin und bei der Funktion von Enzymen beteiligt sind; dies ist in den oben genannten Arbeiten diskutiert.

Zu den erwähnten Veränderungen der Umgebung gehört insbesondere die Änderung des Hydratationsgrades. In Bereichen von Proteinmolekülen - wie dem aktiven Zentrum, zu dem der Zutritt von Molekülen aus der Umgebung häufig erschwert ist - erscheint eine Änderung des Hydratationsgrades z.B. in Abhängigkeit von der Konformation möglich. Die Konformation - die Sekundär- oder Tertiärstruktur - kann darüberhinaus durch eine Veränderung der Geometrie der Wasserstoffbrücke einen großen Einfluß auf den Protontransfer ausüben. Auf diese Weise ist eine gegenseitige Beeinflussung der drei Parameter Protontransfer, Hydratationsgrad und Konformation zu erwarten.

Ähnliche Effekte werden auch bei wasserstoffbrücken- gebundenen Ionenpaaren mit Gruppierungen $\text{NH}_3^+ \dots \text{COO}^-$ vermutet. Dies ist in (4) angeschnitten im Zusammenhang mit der Aktivität von Enzymen (5).

Neben den Arbeiten über biologische Systeme liegen über ähnliche Wasserstoffbrücken zwischen monomeren Modells- substanzen wie Essigsäure und Imidazol eine Fülle von Untersuchungen vor, einige Ergebnisse habe ich in Kap.3.2.3. zusammengestellt (4)(6)-(13)(36). Diese Untersuchungen wurden lösungsmittel- frei, in verschiedenen organischen Lösungsmitteln und in wässriger Lösung durchgeführt. Die Möglichkeit, derartige Experimente auf Polyaminosäuren mit den entsprechenden Seiten- gruppen auszudehnen, wurde bisher nicht genutzt. Diese Substanzen sind bisher vor allem auf ihre Konformation hin untersucht worden. So gibt es eine Reihe von Arbeiten über Poly-L-Glutaminsäure (PLG) und ihre Alkalisalze sowie über Poly-L-Histidin (PLH) und seine Hydrohalide (z.B.(20)-(26) (68)(69)(90)(96)(97)).

Zur Untersuchung solcher Wasserstoffbrücken in Modell- systemen, insbesondere in lösungsmittelfreien und wenig hydratisierten Systemen, ist die IR-Spektroskopie eine sehr geeignete Methode. Einmal ist der Protontransfer an Hand der IR-Banden gut zu beobachten, außerdem geben die Banden ein Maß für die Stärke der Wasserstoffbrücken. Darüberhinaus kann man, wie Kundel und Mitarbeiter gezeigt haben (64), nach dem Auftreten einer kontinuierlichen Absorption im Grundswingungsbereich Aussagen über die Polarisierbarkeit der Brücken machen. Unter bestimmten Bedingungen läßt sich danach auch auf die Dissoziation von leicht polarisierbaren Brücken schließen.

In der vorliegenden Arbeit versuche ich mit Hilfe der IR-Spektroskopie, an Hand monomerer und polymerer Modelle weitere Informationen über die Natur von Wasserstoffbrücken zwischen Histidin- und Carboxylresten zu erhalten. Über die bisherigen Arbeiten an monomeren Modellmolekülen hinaus

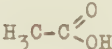
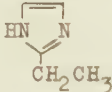
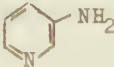
wird von mir auch der Einfluß einer relativ geringen Hydratation von 1-30 Molekülen H_2O pro Assoziat betrachtet. Weiter untersuche ich die Brücken zwischen PLG und verschiedenen N-Basen einschließlich Imidazol und zwischen PLH und verschiedenen Carbonsäuren. Dabei beobachte ich ebenfalls den Einfluß der Hydratation auf diese Wasserstoffbrücken. Schließlich vergleiche ich die Ergebnisse.

Über die Sekundärstruktur der Polypeptidketten in den PLG- und PLH-Systemen kann ich mit Hilfe der Amidbanden ebenfalls einige Aussagen machen. Es zeigt sich, daß die Konformation insbesondere von dem Ausmaß des Protontransfers in den Wasserstoffbrücken abhängig ist. Damit erhält man ein Modell, welches ähnliche Wechselwirkungen zwischen Konformation und Protontransfer zeigt, wie sie in einigen Proteinen erwartet werden können.

Teil A: Assoziat von Carbonsäuren mit N-Basen

1. Zusammenstellung der Systeme und IR-Spektrentabelle

Von mehreren Carbonsäuren und Stickstoffbasen habe ich homogene flüssige Mischungen hergestellt. Die verwendeten Substanzen und ihre pK_a -Werte (27,28) sind in Tab.1 zusammengestellt.

Substanz und Strukturformel	pK_a
Ameisensäure 	3,74
Essigsäure 	4,75
n-Propylamin 	10,7
2-Äthylimidazol 	8,05
Imidazol 	6,95
3-Aminopyridin 	5,98
Pyridin 	5,25

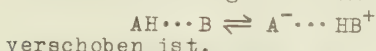
Tab.1: Substanzen und pK_a -Werte

Als Modell für den Glutaminsäurerest dienen dabei Essigsäure und Ameisensäure, für den Histidinrest das Imidazol.

In Tab. 2 sind die untersuchten Systeme zusammengestellt. Sie sind nach der Größe der pK_a -Differenz von Säure und Base angeordnet. Dabei ist

$$\Delta pK_a = pK_a (BH^+) - pK_a (AH)$$

Dieser Wert kann einen Anhaltspunkt dafür geben, nach welcher Seite das Gleichgewicht in einer Wasserstoffbrücke nach



System	ΔpK_a	Spektrum in Abb.
Ameisensäure + n-Propylamin	6,96	11
Essigsäure + n-Propylamin	5,59	11
Ameisensäure + 2-Äthylimidazol	4,31	11
Essigsäure + 2-Äthylimidazol	3,3	11
Ameisensäure + Imidazol	3,21	12
Essigsäure + Imidazol	2,2	12
Essigsäure + 3-Aminopyridin	1,23	12
Essigsäure + Pyridin	0,5	12

Tab. 2: Zusammenstellung der Systeme

Die Mischungen wurden wasserfrei und mit Zugabe von Wasser im Bereich $4000 - 600 \text{ cm}^{-1}$ IR-spektroskopisch untersucht. Die Mischungen von Essigsäure mit Imidazol und mit Pyridin wurden mit Zugabe von 0, 1, 2, 4, 8, 16 und 30 Molekülen H_2O pro Assoziat gemessen, die anderen Mischungen immer mit 0 und 4 Molekülen H_2O pro Assoziat.

2. Experimentelles

2.1. Die Substanzen

Die Substanzen erhielt ich von den Firmen Merck, Fluka und BASF. Sie wurden in folgenden Reinheitsgraden geliefert: Essigsäure, Ameisensäure, Propylamin und Pyridin unter Reinheit p.a. von Merck, Darmstadt, Aminopyridin und Imidazol

unter Reinheit puriss. von Fluka, Buchs (Schweiz, und Äthylimidazol ohne Reinheitsangabe von BASF, Ludwigshafen. Die Basen und die Essigsäure habe ich mit Hilfe von 3 Å Molekularsieb wasserfrei gemacht. Das verwendete Wasser war durch Ionenaustauscher entsalzt.

2.2. Herstellung der Mischungen

Säure und Base habe ich im Molverhältnis 1:1 durch 15 min kräftiges Rütteln miteinander gemischt. Die Dichten der reinen Substanzen entnahm ich (27). In den Systemen Essigsäure + Propylamin, Ameisensäure + Propylamin und Ameisensäure + Äthylimidazol ergaben sich durch die hohe Mischungswärme und den hohen Dampfdruck der Substanzen Schwierigkeiten. Deshalb habe ich die Molverhältnisse durch Titration überprüft und korrigiert. Alle Systeme sind klare, manchmal leicht gelbliche, homogene flüssige Mischungen. Bei einigen Proben bildet sich mehrere Tage nach der Mischung ein festes Salz. Die Mischungen mit Wasser habe ich aus den wasserfreien Proben durch Wasserzugabe hergestellt. Alle Säure - Base - Assoziate sind beliebig mit Wasser mischbar.

2.3. Dichtemessung

Für eine quantitative Auswertung benötigt man die Dichte der Mischungen. Die Dichte der wasserfreien Mischungen der beiden Säuren mit Propylamin und Äthylimidazol habe ich wegen der großen Viskosität mit einem 1 ml Pyknometer gemessen, die Dichte der anderen Mischungen mit Hilfe einer 200 µl Eppendorfpipette. Dazu habe ich die Pipettenspitze voll und leer gewogen, vorher habe ich das Ansaugvolumen mit Wasser geeicht. Die dadurch erreichbare Genauigkeit ist 1 %. Die gemessenen Werte sind in Tab. 3 zusammengestellt.

System	Dichte (g cm ⁻³)				
	wasserfrei		mit 4 H ₂ O		
Ameisensäure + n-Propylamin	1,07		1,02		
Essigsäure + n-Propylamin	1,05		1,02		
Ameisensäure + 2-Äthylimidazol	1,20		1,16		
Essigsäure + 2-Äthylimidazol	1,14		1,09		
Ameisensäure + Imidazol	1,15		1,12		
Essigsäure + Imidazol	1,15		1,12		
Essigsäure + 3-Aminopyridin	1,15		1,12		
Essigsäure + Pyridin	1,06		1,07		
	<u>1 H₂O</u>	<u>2 H₂O</u>	<u>8 H₂O</u>	<u>16 H₂O</u>	<u>30 H₂O</u>
Essigsäure + Imidazol	1,14	1,135	1,10	1,07	1,04
Essigsäure + Pyridin	1,065	1,08	1,05	1,04	1,025

Tab. 3: Dichte der Systeme

2.4. Flüssigkeitsküvette

Zur Aufnahme der Spektren habe ich eine Küvette verwendet, wie sie bei Herbeck (29) beschrieben ist. Die Fenster sind aus polykristallinem hochreinem Germanium. Dieses Material ist beständig gegenüber den verwendeten Säuren und Basen. Die Durchlässigkeit der Fenster reicht nach kleinen Wellenzahlen bis 580 cm⁻¹. Der Probenraum ist keilförmig in eine der beiden Scheiben eingeschliffen. Bei dieser Ausführung werden die bei kleinen Schichtdicken leicht auftretenden Interferenzen vermieden, außerdem wird eine gute Reproduzierbarkeit der Schichtdicke erreicht. Die Küvette ist von einem thermostatisierten Teflonmantel umgeben.

Schichtdicke

Die mittlere Schichtdicke habe ich über die Extinktionen der Benzolbande bei 1959 cm⁻¹ zu 6,2 bzw. 7,1 μ bestimmt (Die Eichkurve dazu ist mit einer Küvette mit variabler

Schichtdicke aufgenommen). Die Reproduzierbarkeit der Schichtdicke ist $\pm 0,1 \mu$. Ebenso gut ist sie auch bei einer Kontrolle mit hochviskosem Paraffinöl. Beim Übergang zu sehr viskosen und gut benetzenden Flüssigkeiten kann die Schichtdicke größer werden. Dieser Fehler kann jedoch durch kurzzeitiges Erwärmen der Küvette weitgehend vermieden werden.

Extinktionskorrektur

Das Lambert-Beer'sche Gesetz gilt nur für Schichten mit einheitlicher Dicke über dem Strahlengangquerschnitt. Bei keilförmigen Schichten muß man die gemessenen Extinktionswerte korrigieren. In (30) ist das für einige Keilformen durchgerechnet. Ich habe die Korrektur wie in (31) mit Hilfe von Eichmischungen aus Paraffinöl und CCl_4 vorgenommen. Die korrigierte Extinktionskala ist in Abb. 1 dargestellt.

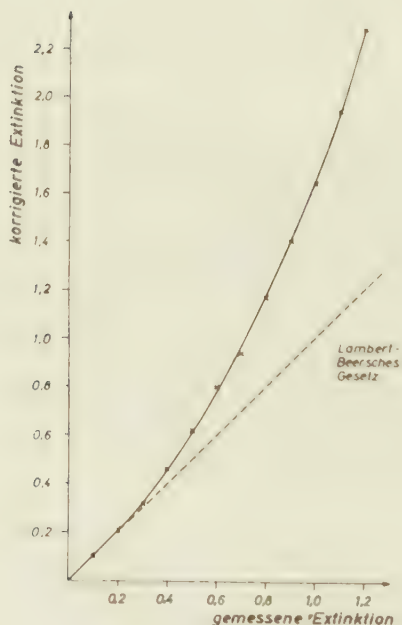


Abb. 1: Extinktionskorrektur für die Keilküvette

2.5. Aufnahme der Spektren

Das Spektrometer

Für die Aufnahme der Spektren stand ein Doppelstrahl-Gitter-Spektrometer Modell 325 der Firma Perkin-Elmer, Überlingen, zur Verfügung. Der Strahlengang wurde mit einem Trockenluftspülgerät wasser- und CO_2 -frei gemacht. Die Wellenzahleinteilung wurde an Hand von Eichbanden überprüft *), die Geräteangaben sind eingehalten.

Die Einstellung des Spektrometers war:

Spaltprogramm 6,5 (wegen der hohen Reflexionsverluste durch das Germanium)

Zeitkonstante 2

Registriereschwindigkeit 0,5 - 1,5 Wellenzahlen / sec, je nach Bereich

Verstärkung nach Bedarf (5 - 10 % Überspringen)

Alle Spektren habe ich ohne Ordinaten- und Abszissen-Dehnung aufgenommen und ohne Abszissen-Dehnung, das letztere beschränkt die Genauigkeit der Ablesung auf ± 3 Wellenzahlen oberhalb 2000 cm^{-1} und auf ± 1 Wellenzahl darunter.

Kompensation

Im Vergleichsstrahlengang habe ich zwei gleichdicke Germaniumscheiben eingebaut, wie ich sie in der Meßküvette verwendet habe. Die Nulllinien der Anordnung ohne Probe habe ich mehrfach überprüft und gegebenenfalls durch Nachpolieren oder leichtes Anätzen der Scheiben der Vergleichsküvette verbessert.

2.6. Auswertung der Spektren, Korrekturfaktor f

Bei der Aufnahme der Spektren ist die Konzentration der sauren und basischen Gruppen im Strahlengang unterschiedlich von System zu System. Da die Schichtdicke nicht verändert werden kann, muß anschließend bei der Auswertung auf die gleiche Zahl von Gruppen bezogen werden. Dies wird in der folgenden Weise durchgeführt::

*) Anleitung zum Gerät PE 325

Es ist die Konzentration der sauren bzw. basischen Gruppen in der Mischung

$$\gamma = \frac{\delta}{M_{AH} + M_B + n M_{H_2O}}$$

mit δ = Dichte der Mischung.

Da ich zwei Küvetten mit verschiedener Schichtdicke d verwendet habe, muß dies ebenfalls berücksichtigt werden. Um den Vergleich der Spektren zu vereinfachen, fasse ich beide Einflüsse in einem Korrekturfaktor f zusammen. Der Faktor f ist auf ein festes Bezugssystem bezogen, und zwar auf die Mischung Essigsäure + Imidazol.

$$f = \frac{\gamma(E + I)}{\gamma} \cdot \frac{d}{d(E + I)}$$

Damit ist f die Zahl, mit der die Extinktionswerte in einem System multipliziert werden müssen, um mit den Werten im System Essigsäure + Imidazol vergleichbar zu sein. f ist in Tab. 4 zusammen mit der Schichtdicke aufgeführt.

System	Korrekturfaktor f				
	<u>wasserfrei</u>	<u>mit 4 H₂O</u>			
Ameisensäure + n-Propylamin **	0,78	1,31			
Essigsäure + n-Propylamin **	0,85	1,40			
Ameisensäure + 2-Äthylimidazol *	1,08	1,64			
Essigsäure + 2-Äthylimidazol *	1,23	1,87			
Ameisensäure + Imidazol *	0,84	1,44			
Essigsäure + Imidazol **	1,0	1,60			
Essigsäure + 3-Aminopyridin **	1,02	1,52			
Essigsäure + Pyridin **	0,99	1,54			
	<u>1 H₂O</u>	<u>2 H₂O</u>	<u>8 H₂O</u>	<u>16 H₂O</u>	<u>30 H₂O</u>
Essigsäure + Imidazol *	1,15	1,30	2,22	3,51	5,83
Essigsäure + Pyridin **	1,10	1,22	2,01	3,06	4,99

* Schichtdicke 6,2 μ , ** Schichtdicke 7,1 μ

Tab. 4: Korrekturfaktor f für den Vergleich der Extinktionswerte

3. Protontransfer in Abhängigkeit vom ΔpK_a

3.1. COOH- und CO₂⁻-Banden im Bereich 2000 - 1000 cm⁻¹

Die Ablösung des Protons führt bei den Carbonsäuren zu einer wesentlich geänderten Bandenstruktur im Bereich 2000 - 1000 cm⁻¹ des IR-Spektrums. Neben dem Verschwinden der OH-Banden treten Effekte auf, die durch eine Umordnung des Elektronensystems bedingt sind; dabei geht die Struktur mit einem doppelt und einem einfach gebundenen Sauerstoffatom in eine Struktur mit im wesentlichen gleichberechtigten C=O-Bindungen (mesomerer Bindungsausgleich) über.



Das Auftreten und Verschwinden der COOH- und CO₂⁻-Banden liefert in den vorliegenden Systemen die beste Angabe über den Protontransfer. Das liegt einmal an ihrer großen Intensität, zum anderen daran, daß die ν C=O-Bande in keiner Mischung von anderen Banden überlagert wird. In den nächsten Abschnitten werden noch weitere Gründe deutlich, daß diese Banden ein gutes Maß für den Protontransfer sind.

Zuordnung bei den Säuren und Na-Salzen

Ameisensäure und Essigsäure sind in der monomeren Form im Dampfzustand mehrfach ausführlich IR-spektroskopisch untersucht worden (32, 33). Die Bandenlagen gebe ich für Ameisensäure nach (34) an, für Essigsäure nach (35). Die letzteren Werte stimmen fast genau mit denen von (36) überein, worin die Werte für Monomere in einer Argonmatrix angegeben sind. Die Banden der flüssigen Säure gebe ich nach eigenen Messungen an (37). Die Zuordnung der Banden der COOH-Gruppen in den Dimeren ist in (38) ausführlich diskutiert. Danach handelt es sich bei den Banden um 1250 cm⁻¹ und 1350 cm⁻¹ um gekoppelte Schwingungszustände mit Beteiligung der ν CO- und δ OH-Schwingung. Dabei hat die bei höheren Wellenzahlen gelegene Bande mehr δ OH-, die andere mehr ν CO-Charakter. Der Einfachheit halber bezeichne ich die Banden in Anlehnung an die Autoren als δ OH und ν CO.

Die Na-Salze der Ameisen- und Essigsäure sind ebenfalls von mehreren Autoren IR-spektroskopisch untersucht worden. Die Lage der Banden gebe ich nach (39) an.

Die Banden in den Mischungen mit den N-Basen

Die Banden sind in Tab. 5 zusammengestellt. Zum Vergleich sind die Banden der reinen Säuren und der Na-Salze nach der oben angeführten Literatur hinzugefügt.

Das Verhalten der COOH- und CO_2^- -Banden im Bereich $2000-1000\text{ cm}^{-1}$ ist in Abb. 2 an einigen Beispielen zu sehen, die Gesamtspektren und die Spektren der anderen Mischungen sind in Abb. 11 und 12 dargestellt.

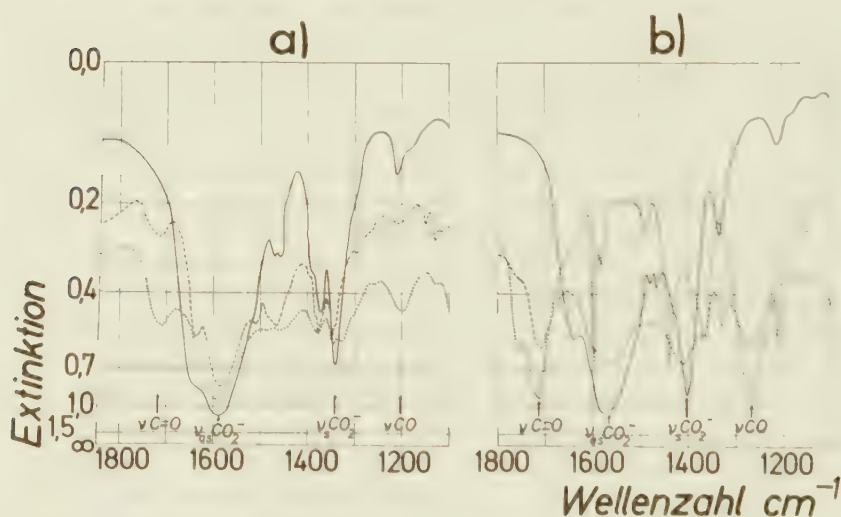


Abb. 2: IR-Spektren: a) —Ameisensäure + n-Propylamin, ---Ameisensäure + 2-Athylimidazol, ...Ameisensäure + Imidazol; b) —Essigsäure + n-Propylamin, ---Essigsäure + Imidazol, ...Essigsäure + Pyridin

System	ν C=O	δ OH	ν CO	$\nu_{as} \text{ CO}_2$	$\nu_s \text{ CO}_2$
Ameisensäure + n-Propylamin	-	-	-	1588 vs	1343 vs
Essigsäure + n-Propylamin	-	-	-	1575 vs	1402 vs
Ameisensäure + 2-Äthylimidazol	1710 w-m	n.i. *)	1205 w	1584 s	1348 s
Essigsäure + 2-Äthylimidazol	1755 sh, w 1711 m	1365 sh, m	1263 m	1563 vs	1405 s
Ameisensäure + Imidazol	1711 m	verdeckt	1201 w-m	1585 s	1347 m
Essigsäure + Imidazol	1755 sh, w 1711 m-s	1367 sh, m	1266 m, br	1560 vs	1410 s
Essigsäure + 3-Aminopyridin	1755 sh, w 1711 s	1367 m	1268 vs	verdeckt	1405 w
Essigsäure + Pyridin	1755 m 1714 vs	1368 m-s	1270 vs	-	-

Essigsäure, flüssig	1761 sh, m 1721 vs	1423 s	1297 vs	-	-
Essigs., monomer	1788 vs	1182 vs	1264 m	-	-
Essigs., Na-Salz	-	-	-	1583 vs	1421 vs
Ameisens., flüssig	1722 vs	1361 s	1200 vs	-	-
Ameisens., monomer	1783 vs	1101 s	1200 s	-	-
Ameisens., Na-Salz	-	-	-	1591 vs	1351 s

Tab. 5: COOH- und CO₂-Banden

*) n.i.= nicht identifiziert

Aus der Tab. 5 und den Abbildungen der wasserfreien Mischungen geht hervor, daß man die Systeme in drei Gruppen einteilen kann:

1. Systeme mit CO_2^- -Banden, ohne COOH -Banden

Hierzu gehören die Mischungen Ameisensäure + n-Propylamin (Abb. 2a) und Essigsäure + n-Propylamin (Abb. 2b). Die CO_2^- -Banden sind in beiden Spektren sehr kräftig ausgeprägt. Dagegen sind die COOH -Banden nicht vertreten, insbesondere ist an der Stelle der $\nu\text{C=O}$ -Bande um 1715 cm^{-1} keine Schulter zu erkennen. Danach ist das Proton vollständig von der Säure abgelöst, also zur Base übergetreten.

2. Systeme mit COOH -Banden, ohne CO_2^- -Banden

Dies ist die Mischung Essigsäure + Pyridin (Abb. 2b). Die COOH -Banden, insbesondere die $\nu\text{C=O}$ bei 1720 cm^{-1} und die $\nu\text{C-O}$ bei 1270 cm^{-1} sind sehr kräftig, dagegen sind keine Absorptionen an der Stelle der CO_2^- -Banden zu sehen. Danach hält sich das Proton an der Säuregruppe auf.

3. Systeme mit CO_2^- - und COOH -Banden

In den anderen wasserfreien Mischungen beobachtet man keine kontinuierliche Verschiebung von Banden der COOH -Gruppe zu denen der CO_2^- -Gruppe. Statt dessen sind die Banden beider Gruppierungen zu sehen; was die einen an Intensität verlieren, gewinnen die anderen. In diesen Systemen hält sich also das Proton offenbar zeitweise an der Säure, zeitweise an der Base auf, es liegt also ein Gleichgewicht der Form $\text{AH}\cdots\text{B} \rightleftharpoons \text{A}^-\cdots\text{HB}^+$ vor.

Nach diesen Beobachtungen der Banden hält sich das Proton in der Wasserstoffbrücke entweder an der Säure oder an der Base auf. Im folgenden Absatz gehe ich auf die Frage ein, ob bei einigen der vorliegenden Wasserstoffbrücken andere Verhältnisse vorliegen, die entweder gar keinen ausgeprägten oder andere COOH - bzw. CO_2^- -Banden zur Folge haben. Dies ist für die quantitative Auswertung wichtig.

Neben einem Gleichgewicht $AH \cdots B \rightleftharpoons A^- \cdots HB^+$ könnte ja in den Systemen auch ein Anteil von symmetrischen Strukturen der Art $A \cdots H \cdots B$ mit einem Einfachminimumpotential für das Proton vorliegen. Hadži et al. (40) haben bei einigen festen 1:1-Assoziaten von Carbonsäuren mit ihren Salzen, so im $NaH(CH_3COO)$ keine üblichen ν_{C-H} - oder $\nu_{C=O}$ -Banden gefunden, sondern ein Bandenpaar, dessen Absorptionen zwischen denen der $\nu_{C=O}$ und der ν_{C-O} bzw. der ν_{CO_2} und der ν_{CO} liegen. Die Autoren erklären diese Befunde durch das Auftreten eines Einfachminimumpotentials. Außer diesen Carboxylbanden treten dort sehr kräftige breite Absorptionen im Bereich $1200 - 600 \text{ cm}^{-1}$ auf. Solche Banden sind in den vorliegenden Systemen jedoch nicht zu beobachten. Weiter bestünde die Möglichkeit, daß die Banden mit abnehmender Intensität immer breiter werden. Sie könnten als Folge einer schnellen Protonfluktuation diffus verfließen und ineinander übergehen. Dies ist jedoch, wie man aus den Spektren sieht, ebenfalls nicht der Fall. All dies wird durch die Betrachtung der Abb. 3 veranschaulicht.

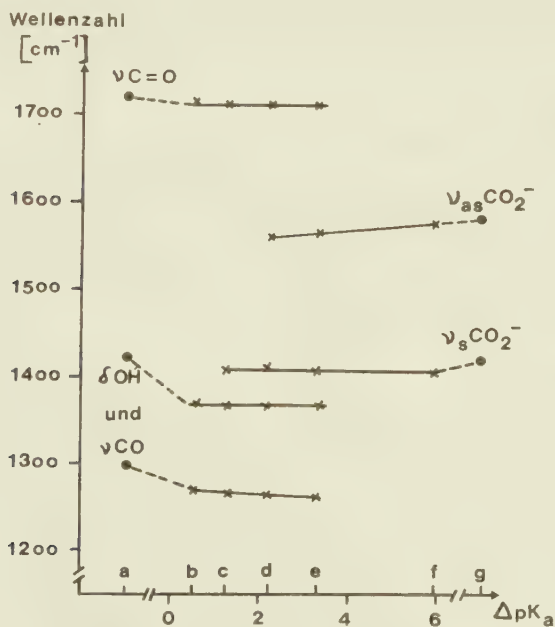


Abb. 3: $COOH^-$ und CO_2^- -Banden in Essigsäure - N-Base-Assoziaten. a) Säure-Dimere, b) Pyridin, c) 3-Amino-pyridin, d) Imidazol, e) 2-Äthylimidazol, f) n-Propylamin, g) Na-Salz

Die Abbildung zeigt die Bandenlagen in Abhängigkeit vom ΔpK_a . Man sieht, daß keine Tendenz zu einem kontinuierlichen Übergang von den Banden der COOH-Gruppe zu denen der CO_2^- -Gruppe besteht. Diese Überlagerungen bestätigen die oben gezeigte Schlußfolgerung, daß sich das Proton entweder an der Säuregruppe oder an der Base aufhält.

Die Lage der Banden ändert sich - bei der gleichen Säure - in Abhängigkeit vom pK_a der Base sehr wenig. In Tab. 2 und Abb. 3 sind zum Vergleich auch die COOH-Banden der monomeren und flüssigen Säure und die CO_2^- -Banden der Na-Salze aufgeführt. Die Verschiebungen zeigen deutlich, daß in allen Mischungen starke Wechselwirkungen zwischen Säure und Base vorliegen. Daß es sich bei diesen Wechselwirkungen um Wasserstoffbrücken handelt, zeigen die breiten kräftigen Absorptionen in den Spektren aller Mischungen im Bereich $3000 - 1500\text{ cm}^{-1}$. Diese Absorptionen sind charakteristisch für starke Wasserstoffbrücken (s. 3.5.).

Die COOH-Banden

Die Lage dieser Banden ist der in den flüssigen Säuren sehr ähnlich. Die $\nu C=O$ -Bande verschiebt sich in den vorliegenden Systemen mit steigendem ΔpK_a ein wenig zu kleineren Wellenzahlen. Das ist ein Einfluß der $CH\cdots N$ -Brücken, die hier nach mit zunehmendem ΔpK_a kräftiger werden, solange noch kein Protontransfer eingetreten ist.

Die CO_2^- -Banden

Die Lage des Schwerpunkts der Banden wandert mit zunehmendem ΔpK_a ein wenig nach größeren Wellenzahlen. Dies ist darauf zurückzuführen, daß die $NH^+\cdots O^-$ -Brücken, die sich durch den Protontransfer gebildet haben, mit zunehmendem ΔpK_a schwächer werden. Gleichzeitig vergrößert sich der Abstand der Banden ein wenig. Eine schwächer werdende Störung durch eine $NH^+\cdots O^-$ -Wasserstoffbrücke sollte neben dem erwähnten Effekt auch eine Erhöhung der Symmetrie in der $-CO_2^-$ -Gruppe und damit ein Zusammenwandern der Banden zur Folge haben (41). Dieses von den Erwartungen abweichende Ergebnis ist vermut-

lich auf einen Einfluß der zweiten funktionellen Gruppe bei den Imidazolen - auf das zweite O-Atom der -CO_2^- -Gruppe - zurückzuführen.

Struktur der $\nu\text{C=O}$ -Bande

a) Die Bande bei 1755 cm^{-1} bei den Mischungen mit Essigsäure:

Diese Bande tritt in den Spektren aller Mischungen auf. Ihre Intensität zeigt denselben Gang wie die $\nu\text{C=O}$ -Bande. Das legt folgende Erklärung nahe: Die Bande entsteht durch monomere oder schwach gebundene Säure, oder sie entsteht durch Fermiresonanz mit der $\nu\text{C-C}$ -Oberschwingung (42). Die $\nu\text{C-C}$ -Bande liegt in den vorliegenden Mischungen ohne Protontransfer bei 878 cm^{-1} . Sie verschwindet wie die $\nu\text{C=O}$ -Bande bei Protontransfer und taucht bei 918 cm^{-1} als Schwingung des Acetat-Ions wieder auf (s.3.3.). Bei der Mischung mit Pyridin habe ich die Temperatur von 5°C bis 75°C variiert (Abb. 4). Bei der Temperaturerhöhung nimmt die Bande nur wenig zu. Das spricht für die Erklärung durch Fermiresonanz. Zwei Gründe sprechen ebenfalls hierfür: Der Befund, daß diese Struktur bei substituierten Essigsäuren nicht gefunden wird, und das Fehlen einer entsprechenden Struktur bei den COH-Banden der Essigsäure.

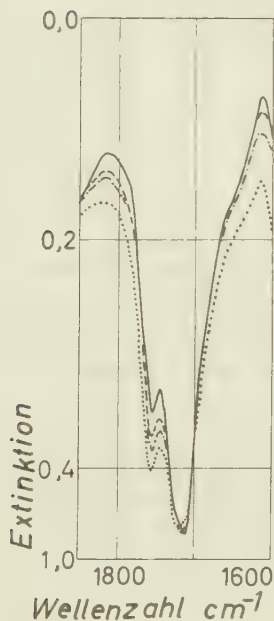


Abb. 4:

IR-Spektren: $\nu\text{C=O}$ -Bande bei Essigsäure + Pyridin in Abhängigkeit von der Temperatur:

— 5°C
 --- 25°C
 ... 50°C
 - . - 75°C

- b) Die Schulter bei 1725 cm^{-1} bei den Essigsäuremischungen:
An der kurzwelligen Flanke der $\nu\text{C=O}$ -Bande tritt in fast allen Systemen eine Schulter auf. Diese Schulter gehört wahrscheinlich zu schwächer gebundenen Molekülen; dafür spricht, daß sie bei Erhöhung der Temperatur verschwindet und die Bande (abgesehen von der oben besprochenen Schulter bei 1755 cm^{-1}) symmetrisch wird.
- c) Die Schulter bei 1735 cm^{-1} bei den Mischungen mit der Ameisensäure kann wie unter b) erklärt werden.*

3.2. Protontransfer

3.2.1. Die $\nu\text{C=O}$ -Bande als Maß für den Protontransfer

Als Maß für den Protontransfer kommen im Prinzip alle COOH- und CO_2^- -Banden in Betracht. Das zeigen die Beobachtungen des vorangegangenen Kapitels. Die C=O -Valenzschwingung erweist sich am geeignetsten aus mehreren Gründen:

- a) Sie wird in keiner Mischung durch Basenschwingungen überlagert.
- b) Die Bande erweist sich in Lage und Intensität recht unempfindlich gegenüber Einflüssen der Umgebung.
- c) Sie ist am besten vergleichbar beim Übergang von Essigsäure zu Ameisensäure.

0 und 100 % Protontransfer

Als Bezugssystem für die Intensität der $\nu\text{C=O}$ -Bande in einem derartigen Säure-Base-Assoziat ohne Protontransfer wähle ich das System Essigsäure + Pyridin. In dieser Mischung sind noch keine CO_2^- -Banden zu erkennen. Andererseits sind sehr kräftige $\text{OH}\cdots\text{N}$ -Brücken geknüpft. Wenn die $\nu\text{C=O}$ -Bande verschwunden ist, bedeutet dies 100 % Protontransfer. Dabei sind kräftige $\text{NH}^+\cdots\text{O}^-$ -Brücken ausgebildet.

* In (43) werden ähnliche Doublettstrukturen u.a. bei den Mischungen von Isobuttersäure mit Pyridin beobachtet. Die Autoren schreiben dies einem speziellen Effekt beim Auftreten einer starken Wasserstoffbrücke zu.

Auswertungsverfahren

Die $\nu\text{C=O}$ -Banden habe ich graphisch von den Nachbarbanden abgetrennt. Dabei habe ich mich an die in den Systemen Essigsäure + Pyridin bis Essigsäure + Imidazol gut erkennbaren Bandenformen mit den unsymmetrischen Bandenverbreiterungen gehalten. Die größte Unsicherheit bei diesem Vorgehen bildet wegen der Breite der Banden die Festlegung der Grundlinie mit Berücksichtigung der kontinuierlichen Absorption.

Die Spektren habe ich auf Papier mit Extinktionseinteilung aufgenommen, und bei der Auswertung habe ich die Flächenstücke entsprechend der Extinktionskorrektur nach Abb. 1 gewichtet.

Auswertungsfehler

Im ganzen Bereich von $3000 - 1000 \text{ cm}^{-1}$ ist bei den meisten Spektren eine kontinuierliche Absorption vorhanden (s. Kap. 5). Diese hat bisweilen auch eine wellenzahlabhängige Intensität. Zusammen mit den breiten kräftigen Absorptionen oberhalb von 1700 cm^{-1} stört dies die Festlegung der Grundlinie. Bei der Auswertung der Intensität der $\nu\text{C=O}$ -Bande ergeben sich damit Unsicherheiten von ± 2 bis $\pm 4 \%$. Dabei handelt es sich jedoch um weitgehend systematische Fehler, die für den Vergleich (also für die relativen Intensitäten) weniger ins Gewicht fallen.

3.2.2. Zusätzliche Auswertung der νCO_2^- -Banden

Beide CO_2^- -Banden sind vielfach von Basenschwingungen und Säurebanden überlagert; die $\nu_{\text{as}}\text{CO}_2^-$ -Bande ist in den Systemen mit Wasser besonders schwierig auszuwerten, daher habe ich nur die $\nu_{\text{s}}\text{CO}_2^-$ -Bande ausgewertet. Als Maß für die Intensität bei 100 % Protontransfer habe ich die Systeme Essigsäure + n-Propylamin bzw. Ameisensäure + n-Propylamin herangezogen. Als Grundlinie für die Auswertung der Banden habe ich die Verbindungslinie der Extinktionsminima um 2000 und um 1000 cm^{-1} angenommen. Dabei ergänzen sich die relativen Intensitäten der $\nu\text{C=O}$ und νCO_2^- -Banden in jedem System zu 100 %. Dies Ergebnis bestätigt die Beobachtungen von 3.1, daß sich das Proton entweder an der Säure- oder an der Basegruppe aufhält und keinen Zwischenzustand einnimmt. Danach ist es möglich, die $\nu\text{C=O}$ -Bande allein als Maß für den Protontransfer anzusehen.

3.2.3. Ergebnisse und Diskussion

In Tab. 6 sind die relativen Intensitäten der $\nu\text{C=O}$ -Banden und in Abb. 5 der Protontransfer in Abhängigkeit vom ΔpK_a dargestellt.

System	$I_{\text{rel}} (\nu\text{C=O})$	Protontransfer (%)
Ameisensäure + n-Propylamin	0,0	100
Essigsäure + n-Propylamin	0,0	100
Ameisensäure + 2-Äthylimidazol	0,12	88
Essigsäure + 2-Äthylimidazol	0,365	63,5
Ameisensäure + Imidazol	0,405	59,5
Essigsäure + Imidazol	0,545	45,5
Essigsäure + 3-Aminopyridin	0,897	10.3
Essigsäure + Pyridin	1,0	0

Tab. 6: Relative Intensität der $\nu\text{C=O}$ -Bande

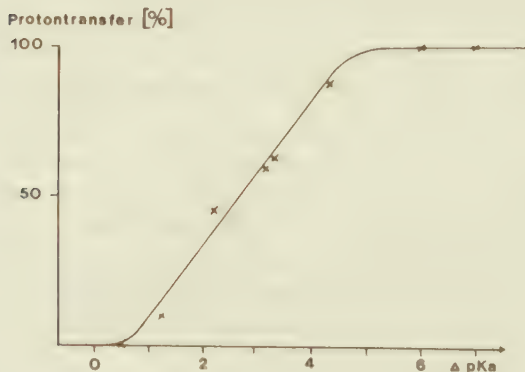


Abb. 5: Protontransfer in Carbonsäure - N-Base-Assoziaten in Abhängigkeit vom ΔpK_a

Die Meßpunkte in Abb. 5 liegen recht gut auf einer Kurve, die eine Art Titrationskurve darstellt. Die Kurve zeigt, daß 50 % Protontransfer in den wasserfreien Mischungen bei einem ΔpK_a von 2,6 auftritt. In Teil B sieht man, daß sich an diesen Verhältnissen bei Ersetzen eines der Partner in der Wasserstoffbrücke durch eine Polyaminosäure mit einer entsprechenden Seitenkette wenig ändert.

Die Abweichungen der Meßpunkte von der in Abb. 5 eingezeichneten Kurve ergeben sich, da die Substanzen nicht nur unterschiedliche pK_a -Werte haben, sondern auch unterschiedliche Struktur. Die von mir verwendeten Basen, die den Verlauf des mittleren Teils der Kurve und damit den Wert des ΔpK_a für 50 % Protontransfer bestimmen, besitzen noch eine zweite funktionelle Gruppe der Form $>NH$ oder $-NH_2$. Um weitere Hinweise zu dieser Strukturabhängigkeit zu erhalten, habe ich auch wasserfreie Mischungen von Essigsäure mit den Basen 2,3-Dimethylpyridin und 2,4,6-Trimethylpyridin spektroskopiert. Dabei erhielt ich für den Protontransfer die Werte 2 % und 10 % (bei einem ΔpK_a von 1,82 und 2,68). Vergleicht man diese Ergebnisse mit Abb. 5, so sieht man, daß sich bei methylsubstituierten Pyridinen ein viel geringerer Grad an Protontransfer bei vergleichbarem ΔpK_a ergibt (bei Extrapolation erhält man für 50 % Protontransfer einen ΔpK_a -Wert von ~4).

Ähnliche Werte für den ΔpK_a bei 50 % Protontransfer wurden bei mehreren Untersuchungen wasserfreier Mischungen von Säuren und Basen gefunden.**) Dabei wurden mehrere Methoden angewendet, einige Ergebnisse sind in Tab. 7 zusammengefaßt.**) Dabei habe ich auch verschieden Einzelwerte für den Protontransfer in solchen Systemen aufgeführt.

*) Ich habe auch ein IR-Spektrum vom System Essigsäure + Imidazol + 4 $CHCl_3$ aufgenommen. Die Banden zeigen den gleichen Grad des Protontransfers an wie im lösungsmittelfreien System.

**) Hierbei haben insbesondere Sobczyk und Pawelka (11a) darauf hingewiesen, daß beim Vergleich verschiedener Methoden auf vergleichbare Auswertung geachtet werden muß.

Systeme	Methode	ΔpK_a	Literatur
aliphatische Carbon- säuren + N-Methylimidazol (flüssige Mischung)	IR	4,2	(6)
subst. Essigsäuren + Pyridin(in $CHCl_3$)	IR	3,0	(7)
Alkohole / Phenole + Propylamin	IR	1,5	(8)
subst. Benzoessäuren + subst. Pyridine (fest und flüssig)	IR	3,7	(9)
subst. Phenole + Trimethylamin(in Benzol)	DK	5,0	(10)
subst. Essigsäuren + Trimethylamin (in Benzol)	DK	7,5	(11)
subst. Essigsäuren + subst. Pyridine (in Benzol)	DK	4,5	(11a)
Phenole + Anilinderivate	DK	-1,75	(12)

Tab. 7a: Werte für den ΔpK_a bei 50 % Protontransfer in Säure-Base-Assoziaten

Systeme	Methode	ΔpK_a	Proton- transfer	Literatur
Benzoessäure in CCl_4 + Triäthylamin in $CHCl_3$ o. DMSO	IR	6,7	nein ja	(13)
Monochloressigsäure + Pyridin, krist.	NQR	2,39	95 %	(14)
Essigsäure + Pyridin	UV	0,5	nein	(15)
2,6-Dinitrophenol + aliphat. Amine (in Dioxan)	UV	7	ja	(16)
Essigsäure + Diäthylamin (in $CHCl_3$ oder CCl_4)	IR	5,74	ja	(17)
Isobuttersäure + Pyridin (in CCl_4)	IR	0,4	nein	(18)
Dichloressigsäure (fest) + 4-Methylpyridin (in Toluol)	IR	4,54	ja nein	(19)
2,6-Dinitrophenol (in Dioxan) + Imidazol (in H_2O)	UV	3,22	nein ja	(4)

Tab. 7b: Protontransfer in Säure-Base-Assoziaten

Die Meßwerte für den ΔpK_a bzw. den Protontransfer werden von mehreren Faktoren beeinflusst:

1. von der Struktur der Säuren und Basen
2. von der Art des Lösungsmittels und von der Konzentration

Ein besonderes Problem in diesem Zusammenhang stellen natürlich die pK_a -Werte in wässriger Lösung dar, diese sind unter den vorliegenden Bedingungen keinesfalls ein direktes Maß für Akzeptor- bzw. Donatoreigenschaften in den betrachteten Gruppierungen. Bei diesen Überlegungen müßte man auch alle Arten der Wechselwirkungen in den Lösungen in Bezug auf die pK_a -Werte diskutieren. Einen besonders interessanten Ansatz bietet in diesem Zusammenhang ein Vergleich der in wässrigem Milieu gemessenen pK_a -Werte mit neuerdings vorliegenden Gasphasen-Aciditäten und -Basizitäten (46,47).

Die Steigung der Kurve "Protontransfer in Abhängigkeit vom ΔpK_a " (Abb. 5) liegt zwischen dem theoretischen Wert in H_2O nach (44) mit $\alpha = 1$ in
$$\log K_{\text{Protontransfer}} = \alpha \cdot \Delta pK_a + C$$

und den Meßwerten in (45) mit $\alpha = 0,43$. Ich erhalte $\alpha = 0,65$. Neben C ist danach auch α von den erwähnten Faktoren abhängig.

3.3. Weitere Bandenänderungen bei den Säuremolekülen

Neben den besprochenen Banden der $COOH^-$ bzw. der CO_2^- -Gruppe ändern sich die anderen Banden der Säuremoleküle ebenfalls mit der Ablösung des Protons. Fast alle diese Banden sind jedoch relativ schwach, darüber hinaus sind sie häufig verdeckt. Über die Banden im Bereich von 1500 bis 600 cm^{-1} (CH-Deformations-, C-C-Valenz- und CO_2 -Scherenschwingung) läßt sich jedoch folgendes sagen:

1. Es treten Banden der Säureform und der Ionenform getrennt auf. Diese Banden gehen mit dem Protontransfer nicht durch kontinuierliche Verschiebung ineinander über.
2. Die Veränderungen der Banden treten im Rahmen der Meßgenauigkeit gleichzeitig mit denen der Carboxylgruppe auf.

Einige dieser Banden sind in Tab. 8 zusammengestellt (Säure und Na-Salz nach (37) und (38)). Wegen der vielfachen Überlagerungen ist im Bereich unvollständigen Protontransfers meistens nur eine Bande der Ionen- oder der Säureform gut zu identifizieren.

System	δ CH	ν C-C	sciss CO ₂
Ameisensäure + n-Propylamin	1374 m-s		775 m-s
Ameisensäure + 2-Äthylimidazol	1378 m		690 vw
Ameisensäure + Imidazol	1378 m		690 w

Ameisensäure (flüssig)	1398 sh,m		679 s
Ameisensäure, Na-Salz	1384 s		774 s
=====			
Essigsäure + n-Propylamin	1340 w-m	918 w	651 m
Essigsäure + 2-Äthylimidazol	n.i.	878 w *	653 m
Essigsäure + Imidazol	1365 sh,vw	878 w	660 w*
Essigsäure + Pyridin	1365 m	878 w-m	620 w

Essigsäure (flüssig)	1363 m	846 w	630 w
Essigsäure, Na-Salz	1341 m	923 m	650 w-m

* mit Banden der Base überlagert

Tab. 8: Änderungen an anderen Banden der Säuren

3.4. Veränderungen an den Banden der Basen

Durch die Beobachtung der Basenbanden sollte man die gleichen Ergebnisse zum Protontransfer erhalten wie mit Hilfe der Carboxylbanden. Tatsächlich zeigen jene Banden in Abhängigkeit vom ΔpK_a einen deutlichen Übergang von der unprotonierten zur protonierten Form der jeweiligen Base. Aus zwei Gründen habe ich mich auf eine qualitative Beschreibung einiger Basenbanden beschränkt:

1. Gerade in dem interessanten Bereich der mittleren ΔpK_a -Werte sind viele Banden schwierig zu beobachten, da in

diesen Systemen weite Bereiche des Spektrums durch die gleichzeitig auftretenden COOH- und CO_2^- -Banden der Säure verdeckt sind.

2. Eine quantitative Auswertung der Basenbanden zur Bestimmung des Protontransfers stößt auf große Schwierigkeiten wegen des unterschiedlichen Aufbaus der Basen. Dieser hat zur Folge, daß sich mit der Protonierung auch ganz unterschiedliche Bandenänderungen ergeben, die sich schwer miteinander vergleichen lassen. So ändert sich z.B. beim Imidazol die Symmetrie des Moleküls mit der Protonierung, beim Pyridin dagegen nicht. Weiter bildet die δNH^+ -Schwingung mit den Schwingungen des Basenrings, die bei ähnlichen Wellenzahlen liegen, gekoppelte Schwingungszustände. Diese sind bei verschiedenen Ringsystemen natürlich ganz unterschiedlich. Außerdem reagieren die Basenbanden mit unterschiedlicher Empfindlichkeit auf die Bildung der $\text{OH}\cdots\text{N-}$ und $\text{NH}^+\cdots\text{O}^-$ -Brücken.

In Kap. 4.13. werde ich die Änderungen einiger Banden der Basen in den Systemen Essigsäure + Pyridin + n H_2O und Essigsäure + Imidazol + n H_2O eingehender besprechen. Im Fall der anderen Basen sind folgende Änderungen mit dem Protontransfer deutlich zu erkennen (Tab. 9).

n-Propylamin 2-Äthylimidazol 3-Aminopyridin

Base in H_2O	1605 s	<1600	—
Assoziat mit Essigsäure	1636 s	1639 m 1630 m	1342 m
Assoziat mit Ameisensäure	1638 s	1639 m 1630 m	
protoniert mit HCl in H_2O	1630 vs	1630 vs	1345 s

Tab. 9: Änderungen an den Banden der Basen mit der Protonierung

Ich habe die vorliegenden Spektren der Mischungen mit den IR-Spektren der Basen und Hydrochloride in wäßriger Lösung verglichen (48). In diesen sind die Bandenlagen - insbesondere der unprotonierten Form - durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zu den Wassermolekülen verändert gegenüber den Banden der reinen Basen.

3.5. Banden der Gruppen in den Wasserstoffbrücken im Bereich $3500 - 1700 \text{ cm}^{-1}$

In den Spektren aller untersuchten Systeme sind neben den meist schwachen CH-Banden in diesem Bereich extrem breite, kräftige Absorptionsbanden zu beobachten. Diese sind charakteristisch für sehr kräftige Wasserstoffbrücken, wie sie bei den vorliegenden Systemen ausgebildet sind. Die Struktur dieser Absorption ändert sich wesentlich mit dem Protontransfer (Beispiele in Abb. 6). Die Schwerpunkte der Banden sind in Tab. 10 zusammengestellt.

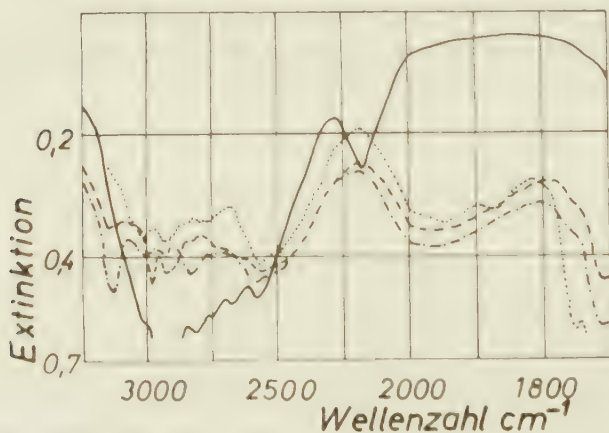


Abb. 6: IR-Spektren: — Essigsäure + n-Propylamin, --- Essigsäure + 2-Athylimidazol, -.- Essigsäure + Imidazol, Essigsäure + Pyridin

Ameisensäure + n-Propylamin	2400 - 3050 vs,vbr	2170 m
Essigsäure + n-Propylamin	2400 - 3050 vs,vbr	2190 m
Ameisensäure + 2-Äthylimidazol	2950 w 2550 vs,br	1955 s,br
Essigsäure + 2-Äthylimidazol	3050 m,br 2550 s,br	1955 s,br
Ameisensäure + Imidazol	3050 w 2600 vs,br	1980 s,br
Essigsäure + Imidazol	3050 m,br 2550 s,br	1975 s,br
Essigsäure + 3-Aminopyridin	verdeckt 2510 s,br	1950 s,br
Essigsäure + Pyridin	2950 m,br 2550 s,br	1950 s,br

Tab. 10: Banden der Gruppen in den Wasserstoffbrücken im Bereich $3500 - 1700 \text{ cm}^{-1}$.

Bei großem ΔpK_a , z.B. in den Mischungen mit n-Propylamin, sind nur zwei Banden vorhanden: eine sehr kräftige, sehr breite zwischen 3050 und 2350 cm^{-1} , die von CH-Banden überlagert ist, und eine schwächere, scharf ausgeprägte Bande um 2150 cm^{-1} . Bei der ersten handelt es sich um die NH-Valenzschwingung in den NH_3^+ -Gruppen, die über Wasserstoffbrücken mit den Carboxylationen verbunden sind. Die extreme Breite dieser Absorption und die Submaxima treten auch in den entsprechenden Hydrohaliden auf (49). Die schwächere Bande bei 2150 cm^{-1} ist vermutlich eine Kombinationsschwingung. Eine ähnliche Bande findet Sandorfy (49) in allen Spektren der von ihm untersuchten Hydrochloride primärer Amine; Waldron ordnet eine entsprechende Bande im Methylamin bei 2075 cm^{-1} einer Kombinationsschwingung δNH_3^+ und CH_3 -Torsion zu (50).

In den Systemen mit $\Delta pK_a < 4$ sind zwei breite Banden zu beobachten bei etwa 2500 und 1950 cm^{-1} . Eine weitere Bande könnte um 3050 cm^{-1} liegen, der Bereich ist von CH-Banden

und NH-Banden überlagert; jedenfalls ist die Bande in allen Systemen relativ schwach. Hadži findet solche Banden in sehr ähnlichen Saure-Base-Mischungen, aber auch in Saure-Assoziaten und Saure-Salz-Mischungen. In (51) hat Hadži diese Banden ausführlich diskutiert und sie A-, B- und C-Banden genannt. In (52) hat der Autor diese Banden neuerlich diskutiert und weitere Literatur angefügt. Zundel (53) findet ebenfalls solche Banden in Saure-Assoziaten. Dort sind Arbeiten über weitere Systeme genannt, die solche Banden zeigen zusammen mit einer Reihe von Arbeiten, die sich mit der Erklärung dieser Absorptionen befassen. Vermutlich handelt es sich bei den zusätzlichen Banden um Oberschwingungen der OH-Deformationsschwingungen (2 δ OH- und 2 γ OH-Banden), die durch Fermiresonanz mit der Valenzschwingung an Intensität gewinnen (54). Bei $\text{NH}^+ \cdots \text{O}^-$ -Brücken tritt entsprechend eine Fermiresonanz mit Kombinationsschwingungen der Basenbanden auf. Überraschend ist, daß diese im Fall der Imidazol- und Pyridinbasen zu sehr ähnlichen Absorptionen führt wie im Fall der $\text{OH} \cdots \text{N}$ -Brücken. Hierbei könnte die Kopplung der NH^+ -Deformationsschwingung mit den Ringschwingungen eine Rolle spielen.

4. Protontransfer in Abhängigkeit von der Wasserzugabe

Zunächst sollen die Systeme besprochen werden, in denen ich den Wassergehalt am meisten variiert habe. Dies sind Essigsäure + Pyridin + $n \text{ H}_2\text{O}$ und Essigsäure + Imidazol + $n \text{ H}_2\text{O}$. Später will ich die Änderungen bei Zugabe von 4 H_2O bei allen untersuchten Systemen diskutieren. Wie bei den wasserfreien Systemen habe ich als erstes die COOH - und CO_2^- -Banden im Bereich $2000 - 1000 \text{ cm}^{-1}$ zusammengestellt. Für die anschließende, quantitative Auswertung des Protontransfers habe ich, wie in 3.2., die integrierte Intensität der $\nu\text{C=O}$ -Bande verwendet. Wie dort dient als Maß für 0 %

Protontransfer die Bande im System Essigsäure + Pyridin. Der relative Fehler bei Ausmessung der $\nu\text{C=O}$ -Bande nimmt in diesen Systemen mit großem Wasseranteil zu, da die $\nu\text{C=O}$ -Bande von der H_2O -Scherenschwingung überlagert wird. In den Mischungen mit 16 und 30 Molekülen H_2O pro Assoziat habe ich die νCO -Bande bei 1260 cm^{-1} zur Auswertung mit herangezogen, da diese in den betreffenden Systemen sehr gut zu beobachten ist.

4.1. Essigsäure + Pyridin + n H_2O (Abb.7)

Im wasserfreien System sind nur die Banden der Säureform vertreten. Bei Zugabe von einem Molekül H_2O pro Assoziat sind ebenfalls noch keine CO_2^- -Banden zu beobachten.*) Erst mit Zugabe von 2 und mehr Molekülen Wasser zu der Mischung nimmt die Intensität der COOH -Banden stetig ab, und dafür tauchen Banden der Ionenform auf; die letzteren werden mit weiterer Wasserzugabe immer kräftiger.

Moleküle H_2O pro Assoziat	$\nu\text{C=O}$	δOH	νCO	$\nu_{\text{as}}\text{CO}_2^-$	$\nu_{\text{s}}\text{CO}_2^-$
0	1755 sh,m 1714 vs	1365 s	1270 vs	-	-
1	1755 sh,w 1712 vs	1367 s	1271 vs	1552 vw	-
2	1755 sh,w 1712 vs	1367 s	1272 vs	1552 vw	1405 vw
4	1711 s	1368 m	1275 s	1552 w-m	1405 w
8	1710 m	1370 sh,m	1277 m	1552 m	1408 w-m
16	1710 sh,w	1370 sh,w	1277 w-m	1551 m	1410 m
30	1710 sh,vw	1370 sh,vw	1277 w	1551 m	1410 m

Tab. 11: COOH - und CO_2^- -Banden in den Systemen Essigsäure + Pyridin + $n\text{H}_2\text{O}$

*) Entsprechend ist dieses erste Wassermolekül auch besonders schwach gebunden (s.4.4.).

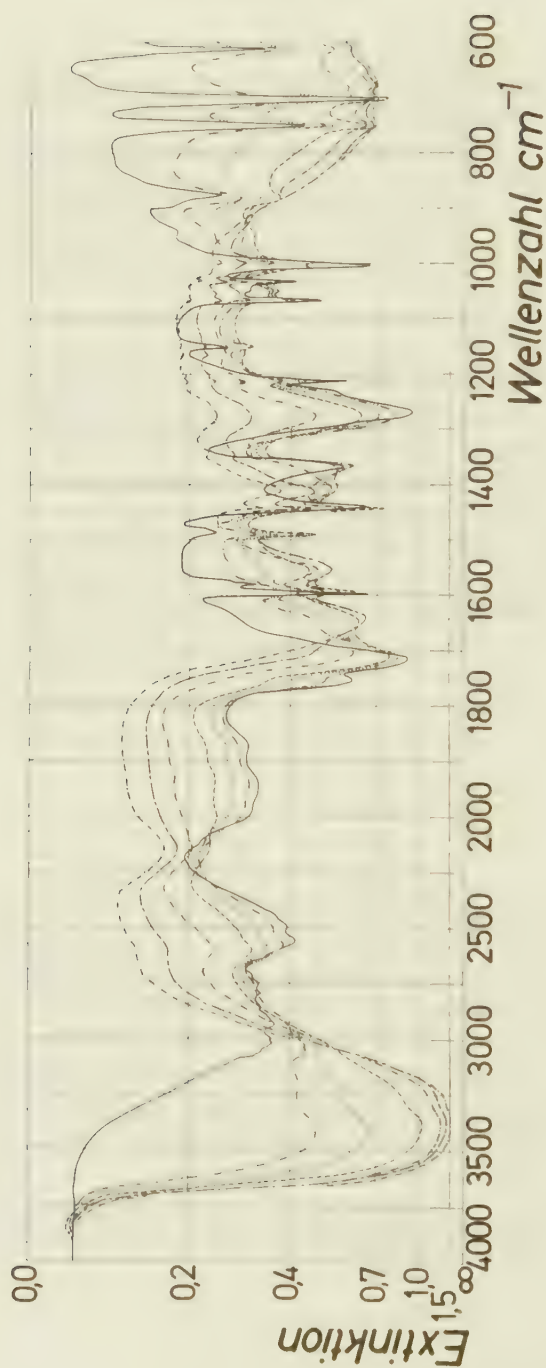


Abb. 7: IR-Spektren von Essigsäure + Pyridin + n H₂O
 — n=0, n=1, n=2, --- n=4, -.-.- n=8, -.-.- n=16, -.-.- n=30

Aus dem Verlauf der Intensität der $\nu\text{C=O}$ -Bande mit der Wasserzugabe sieht man ebenfalls deutlich, daß ein Protontransfer erst bei Zugabe von 2 Molekülen Wasser pro Assoziat einsetzt (Tab. 12 und Abb. 8). Zwischen der Zugabe von 2 und 4 Molekülen Wasser ist die Abhängigkeit des Protontransfers von der Wasserzugabe am größten. Der Einfluß weiterer Wassermoleküle ist relativ gering, so wird erst bei Gegenwart von 30 Molekülen H_2O ein weitgehender Protontransfer erreicht.

	Moleküle H_2O pro Assoziat						
	0	1	2	4	8	16	30
$I_{\text{rel}}(\nu\text{C=O})$	1,0	1,02	0,99	0,775	0,590	0,257	0,018
Protontransfer (%)	0	0	1,0	22,5	41,0	74,3	98,2

Tab. 12: Relative Intensität der $\nu\text{C=O}$ -Bande und Protontransfer in den Systemen Essigsäure + Pyridin + n H_2O .

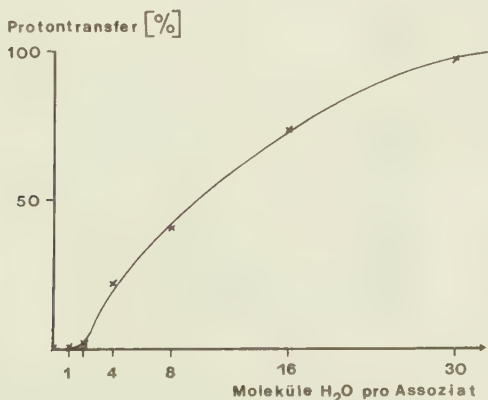


Abb. 8: Protontransfer in Essigsäure + Pyridin + n H_2O

Verschiebung der $\nu\text{C=O}$ -Banden

Mit Zugabe von Wasser verschiebt sich die $\nu\text{C=O}$ -Bande zu kleineren Wellenzahlen (Tab.11). Das entspricht dem Effekt in den wasserfreien Mischungen bei einer Vergrößerung des ΔpK_a . Vor dem Protontransfer wird danach die $\text{OH}\cdots\text{N}$ -Brücke kräftiger. Allerdings kann bei der Verschiebung der $\nu\text{C=O}$ -Bande in den Mischungen mit Wasser auch die direkte Wirkung der bei Anlagerung des Wassers gebildeten Wasserstoffbrücke an die C=O -Gruppe beteiligt sein. Man kann dieses in den vorliegenden Fällen nicht entscheiden, da man immer nur den Einfluß des Wassers auf die $\begin{array}{c} \text{C=O} \\ | \\ \text{O}-\text{H}\cdots\text{N} \end{array}$ -Gruppe als Ganzes beobachten kann.

4.2. Essigsäure + Imidazol + n H_2O (Abb. 1)

In der wasserfreien Mischung Essigsäure + Imidazol sind die Banden der Säureform und der Ionenform mit etwa gleicher Intensität vertreten. Mit der Wasserzugabe nimmt die Intensität der COOH -Banden ab und die der CO_2^- -Banden zu; in der Mischung mit 30 Molekülen H_2O pro Assoziat sind die ersteren vollständig verschwunden.

Moleküle H_2O pro Assoziat	$\nu\text{C=O}$	δOH	$\nu\text{C-O}$	$\nu_{\text{as}}\text{CO}_2^-$	$\nu_{\text{s}}\text{CO}_2^-$
0	1750 sh,w 1711 s	1367 m-s	1260 s	1561 s	1410 s
1	1709 m	1370 sh,m	1268 m-s	1560 s	1411 s
2	1709 w-m	1370 sh,w	1270 m	1562 s	1413 s
4	1709 sh,w	verdeckt	1270 w	1562 vs	1413 vs
8	1707 sh,w	verdeckt	1270 w	1562 vs	1413 vs
16	1707 sh,vw	verdeckt	1275 vw	1564 s	1414 vs
30	-	-	1280 vw	1564 s	1414 s

Tab. 13: COOH - und CO_2^- -Banden in den Systemen Essigsäure + Imidazol + n H_2O

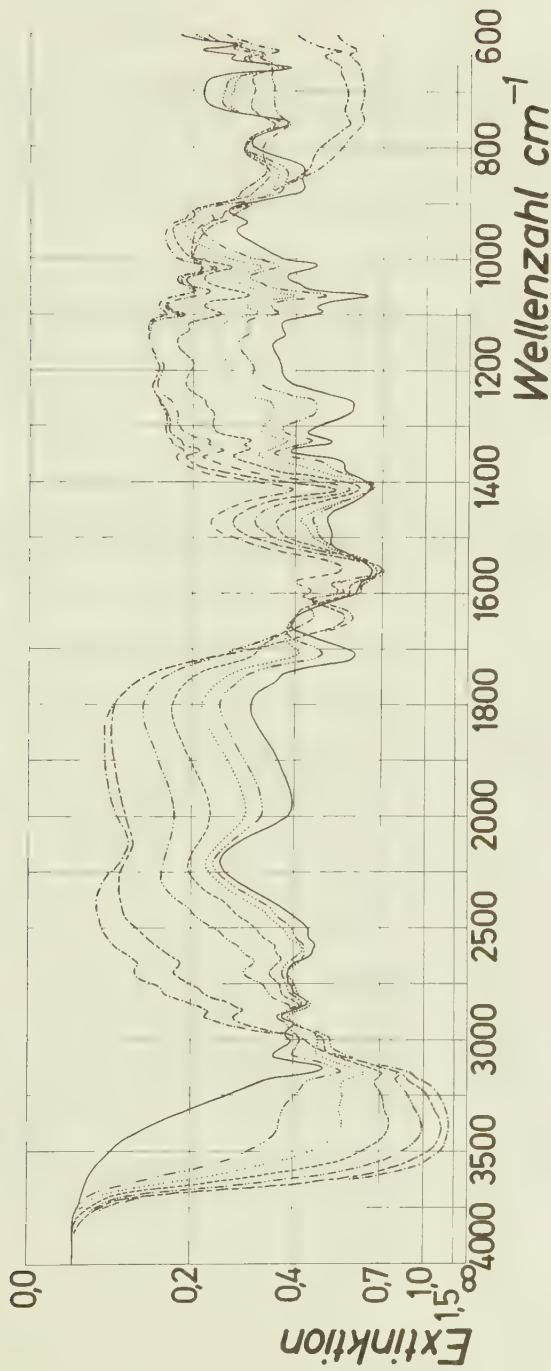


Abb. 9: IR-Spektren von Essigsäure + Imidazol + n H₂O
 — $n=0$, $n=1$, ... $n=2$, --- $n=4$, -.-.- $n=8$, — — — $n=16$, --- $n=30$

Mit Zugabe von Wasser nimmt also auch in diesem System der Protontransfer von der Säure zur Base zu. Quantitativ ist das an Hand der Intensität der $\nu\text{C=O}$ -Bande in Tab. 14 und Abb. 10 dargestellt.

	Moleküle H_2O pro Assoziat						
	0	1	2	4	8	16	30
$I_{\text{rel}}(\nu\text{C=O})$	0,545	0,330	0,210	0,077	0,019	-	-
Protontransfer (%)	45,5	67,0	79,0	92,3	98,1	99,5*	100

* nach der Intensität der $\nu\text{C=O}$ -Bande

Tab. 14: Relative Intensität der $\nu\text{C=O}$ -Bande und Protontransfer in den Systemen Essigsäure + Imidazol + n H_2O

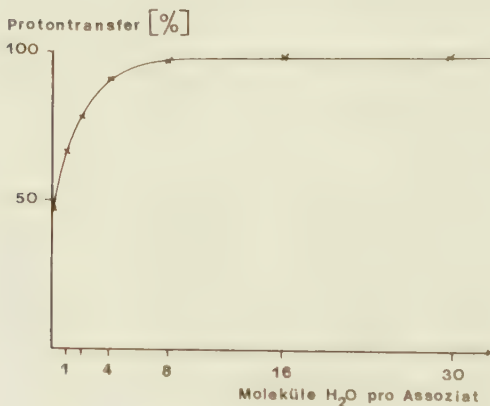


Abb. 10: Protontransfer in Essigsäure + Imidazol + n H_2O

In diesem System ist der Einfluß auf den Protontransfer bei Zugabe von Wassermolekülen größer als bei den Pyridinmischungen, am größten ist er beim ersten Wassermolekül. Bei Anwesenheit von 8 Molekülen H_2O pro Assoziat beobachtet man in der Mischung weitgehenden Protontransfer.

Verschiebung der $\nu C=O$ -Bande

Wie in den Mischungen mit Pyridin wandert auch hier die $\nu C=O$ -Bande mit der Wasserzugabe zu kleineren Wellenzahlen (Tab. 13).

4.3. Veränderungen an den Banden der Basen

In diesen beiden Systemen sind die Veränderungen an den Banden der Basen gut zu verfolgen. Es verschwinden die Banden der unprotonierten Form und an anderer Stelle tauchen dafür die der protonierten Form auf bzw. werden kräftiger (Tab.15). Das entspricht den Veränderungen an den Banden der Säuren.

Die Bandenlagen sind in vielen Fällen durch die Ausbildung der starken Wasserstoffbrücken beeinflusst. So reagieren z.B. die Banden um 1590 cm^{-1} beim Pyridin besonders empfindlich auf eine Ausbildung von $OH\cdots N$ -Wasserstoffbrücken; im reinen Pyridin ist eine Bande bei 1583 cm^{-1} sehr kräftig ausgebildet, in Wasser wird sie bei 1592 cm^{-1} gefunden*. Im Fall des Pyridins sind diese Änderungen ausführlich untersucht worden (55, 56). Auch bei Imidazol und deutlicher noch bei PLH ist es die bei den größten Wellenzahlen gelegene Ringschwingung, die am empfindlichsten auf eine Wasserstoffbrücke zum N-Atom reagiert.

In manchen Fällen beobachtet man eine kontinuierliche Verschiebung der Banden mit der Wasserzugabe, z.B. bei ν_{14} bei Imidazol. Etwas derartiges tritt ein, wenn die Banden der unprotonierten und protonierten Form nahe beieinander liegen, so daß sie nicht mehr aufgelöst werden. Zu den Veränderungen der Banden mit dem Protontransfer kommen bei Hydratation die durch die wässrige Umgebung. Dies zeigt, wie problematisch eine quantitative Auswertung dieser Bandenänderungen ist.

*Dort wird auch eine Kombinationsschwingung gefunden.

Zuordnung (*)	Pyridin in H ₂ O	Pyridin + Essigsäure		Pyridin + HCl in H ₂ O
		wasserfrei	+ 2 H ₂ O	+ 8 H ₂ O
ν_4				
$\nu_9 + \nu_{10}$	1592 s	1597 vs	von H ₂ O verdeckt	1591 m
			1591 s	1634 s
ν_{14}	1441 vs	1488 w	1488 m-s	1488 m-s
		1439 s	1441 s	1441 m
ν_{16}	1216 m	1216 m	1253 sh	1253 m, br
			1216 w	1216 w
ν_7	1068 m-s	1068 m-s	1169 w	1169 w-m
			1068 m	1068 w-m
ν_{26}	704 vs	703 vs	704 s	704 m
			682 w	682 s

Zuordnung (**)	Imidazol in H ₂ O	Imidazol + Essigsäure		Imidazol + HCl in H ₂ O
		wasserfrei	+ 2 H ₂ O	+ 8 H ₂ O
ν_{13}	1427 m	1534 sh	1594 w	1592 m
		1427 *	1487 vw	1590 s
ν_{14}	1329 m	1329 m	1329 w-m	1322 vw
ν_8	1067 s	1067 m	1067 w	1065 w, sh
			1059 vw, sh	1065 m
ν_{18}	755 m-s	765 sh, w	762 m	763 w-m
		756 m		760 m-s
ν_{CH}	verdeckt	3142 sh, m	3145 m-s	3145 sh, m
		3125 s	3125 sh, m	verdeckt

*) nach (57) **) nach (58)

Tab. 15: Banden des Pyridins und Imidazols in den Systemen Essigsäure + Base + n H₂O

4.4. Die übrigen Systeme mit 4 Molekülen H_2O pro Assoziat

Die übrigen, in Kap. 3 besprochenen Systeme habe ich in einer Mischung mit 4 Molekülen H_2O pro Assoziat untersucht (Abb. 11 und 12). Die $COOH^-$ und CO_2^- -Banden der Säuren zeigen in allen Systemen eine durch die Zugabe von Wasser bewirkte Erhöhung des Protontransfers an. Die Banden sind in Tab. 16 zusammengestellt.

Ähnliche Ergebnisse erhielt ich bei Zugabe von Wasser zu den Mischungen Essigsäure + N-Methylimidazol und Essigsäure + 2,4,6-Trimethylpyridin. In dem letzten System beobachtete ich eine Zunahme des Protontransfers von 10 auf 100 %, wenn ich den Wasseranteil von 0 bis 30 Molekülen Wasser pro Assoziat erhöhte.

Bei etwa gleichem Ausmaß des Protontransfers (vgl. Tab. 5) ist die Lage der Banden ähnlich der in wasserfreien Systemen bei entsprechend größerem ΔpK_a .

Den Protontransfer habe ich wie oben beschrieben an der $\nu C=O$ -Bande gemessen. Die Ergebnisse sind in Tab. 17 und Abb. 13 dargestellt.

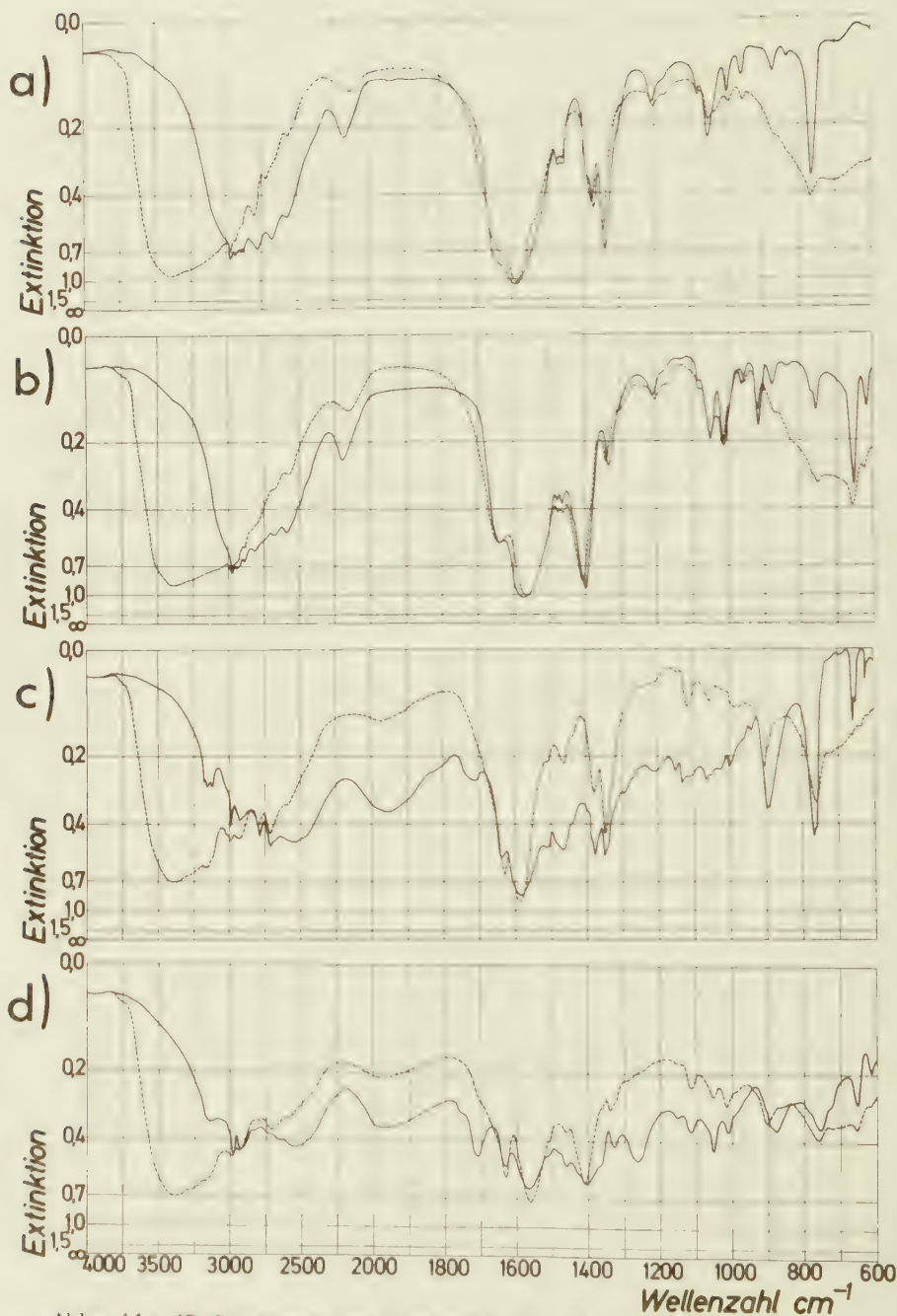


Abb. 11: IR-Spektren von Carbonsäure - N-Base-Assoziaten;
 — wasserfrei, --- mit 4 H_2O /Assoziat. a) Ameisensäure +
 n-Propylamin, b) Essigsäure + n-Propylamin, c) Ameisen-
 säure + 2-Athylimidazol, d) Essigsäure + 2-Athylimidazol

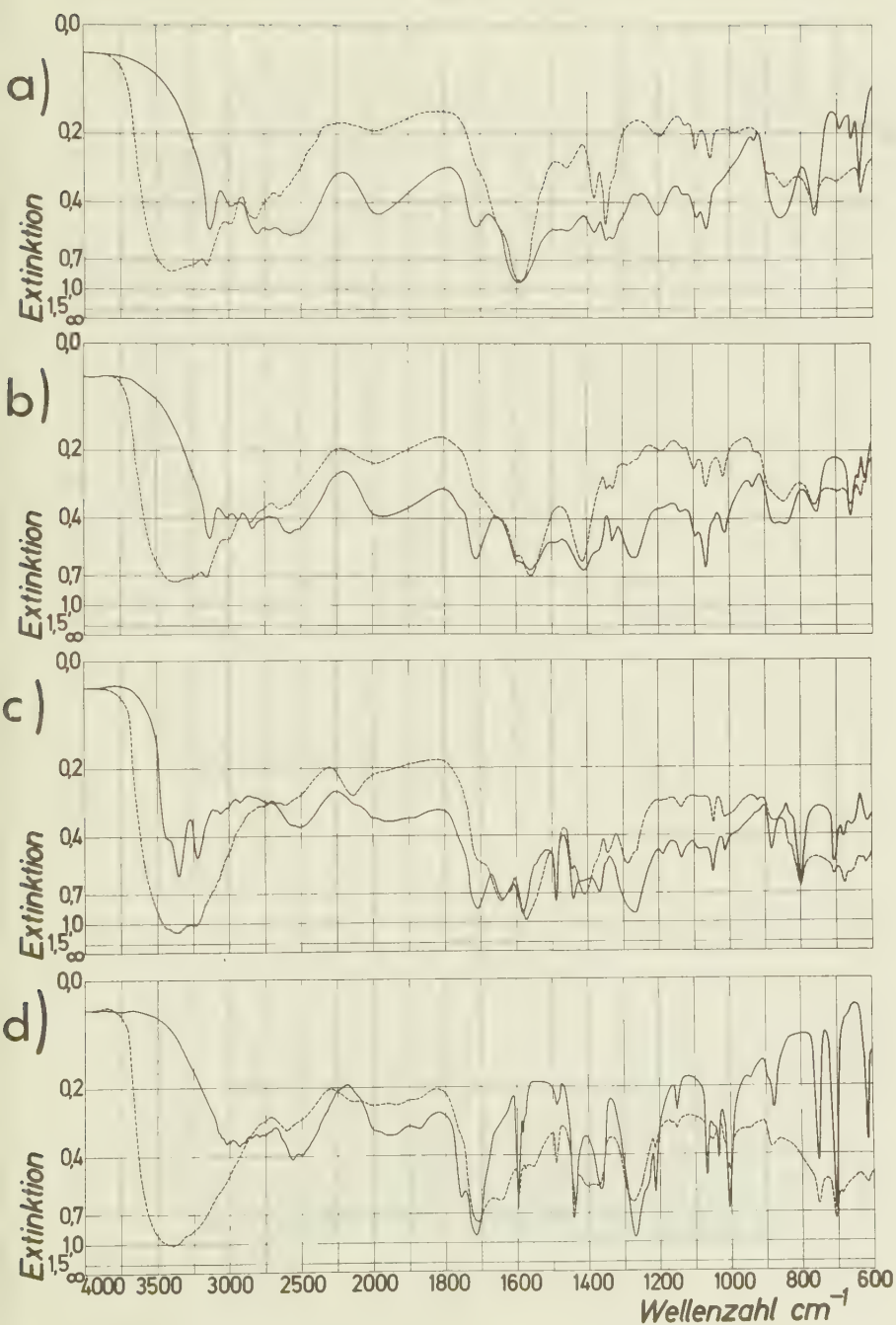


Abb. 12: IR-Spektren von Carbonsäure - N-Base-Assoziaten;
 — wasserfrei, --- mit 4 H_2O /Assoziat. a) Ameisensäure+
 Imidazol. b) Essigsäure+Imidazol. c) Essigsäure +
 Imidazol.

System (+ 4 H ₂ O)	$\nu_{C=O}$	δ_{OH}	ν_{CO}	$\nu_{as} CO_2^-$	$\nu_s CO_2^-$
Ameisensäure + n-Propylamin	-	-	-	1588 vs	1349 s
Essigsäure + n-Propylamin	-	-	-	1568 vs	1409 vs
Ameisensäure + 2-Athylimidazol	-	-	-	1587 vs	1348 s
Essigsäure + 2-Athylimidazol	1711 sh, w	verdeckt	1270 vw	1562 vs	1409 vs
Ameisensäure + Imidazol	1710 w	n.i.	1280 w	1588 vs	1349 s
Essigsäure + Imidazol	1709 sh, w	n.i.	1270 w	1562 vs	1413 vs
Essigsäure + β -Aminopyridin	1706 m	1370 m	1270 m	1563 m	1407 s
Essigsäure + Pyridin	1711 s	1368 m	1275 s	1552 w-m	1405 w

Tab. 16: COOH- und CO₂⁻-Banden in den Systemen mit 4 Molekulen H₂O pro Assoziat

System	$I_{\text{rel}} (\nu \text{C}=\text{O})$	Proton- transfer (%)	Zunahme des Protontransfers durch 4 H_2O (%)
Ameisensäure + n-Propylamin + 4 H_2O	-	100	-
Essigsäure + n-Propylamin + 4 H_2O	-	100	-
Ameisensäure + 2-Äthylimidazol + 4 H_2O	0,005	99,5	12,0
Essigsäure + 2-Äthylimidazol + 4 H_2O	0,015	98,5	36,0
Ameisensäure + Imidazol + 4 H_2O	0,027	97,3	37,8
Essigsäure + Imidazol + 4 H_2O	0,077	92,3	45,8
Essigsäure + 3-Aminopyridin + 4 H_2O	0,221	77,9	67,6
Essigsäure + Pyridin + 4 H_2O	0,775	22,5	22,5

Tab. 17: Zunahme des Protontransfers bei Zugabe von 4 Molekülen H_2O pro Assoziat

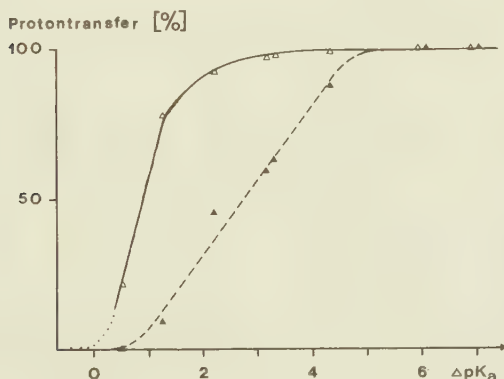


Abb. 13: Protontransfer in den Systemen Carbonsäure + N-Base + 4 H_2O in Abhängigkeit vom ΔpK_a ——. Zum Vergleich: --- die wasserfreien Assoziante

Die Änderung des Protontransfers mit der Zugabe von 4 Molekülen H_2O pro Assoziat ist im Fall der Mischung Essigsäure + 3-Aminopyridin am größten. Das liegt daran, daß die Empfindlichkeit des Gleichgewichts - wie zu erwarten - um den Punkt 50 % Protontransfer am größten ist. Beim Imidazol ist entsprechend die Wirkung des ersten Wassermoleküls besonders hoch (Abb. 10, Kap. 4.2.).

Die Erhöhung des Protontransfers durch die Wasserzugabe hat zur Folge, daß bei Anwesenheit von 4 H_2O pro Assoziat 50 % Protontransfer nun bei einem ΔpK_a von nur noch 0,9 vorliegt (Abb. 13).

Weiter sieht man, daß durch die Anwesenheit von Wasser der Bereich des Protontransfers verkleinert ist. Dies zeigt eine Erhöhung der Unsymmetrie der Potentiale durch die Dipolfelder der angelagerten Wassermoleküle (s. 5.5.).

4.5. Banden der Gruppen in den Wasserstoffbrücken im Bereich 3500 - 1700 cm^{-1}

Beim Vergleich mit den wasserfreien Systemen sieht man, daß sich gegenüber diesen die Struktur der Absorptionsbanden im Bereich 3500 - 1700 cm^{-1} relativ wenig ändert.

Man beobachtet jedoch eine Verlagerung der Intensität von den Banden um 1950 und 2600 cm^{-1} zu höheren Wellenzahlen bei den Mischungen mit Imidazol und 3-Athylimidazol. Das zeigt, wie aus den $OH \cdots N$ -Brücken $NH^+ \cdots O$ -Brücken werden.

In den Mischungen mit n-Propylamin nimmt die Bande um 2170 cm^{-1} ab, d.h. die Fermiresonanz wird schwächer, da die Brücken schwächer werden. Diese Änderungen könnten auch für eine Dissoziation der gebildeten Ionenpaare sprechen. Die $NH^+ \cdots O$ -Brücken könnten aufgebrochen werden, was die Bildung schwächerer Brücken zum angelagerten Wasser zur Folge hätte. Andere Beobachtungen lassen jedoch darauf schließen, daß bei Anwesenheit von nur 4 Wassermolekülen pro Assoziat die $NH^+ \cdots O$ -Brücken noch weitgehend bestehen bleiben (5.5. und Kap. 6).

In den Mischungen mit mehr als 8 Molekülen Wasser pro Assoziat werden die Banden in diesem Bereich durch die kräftigen Banden des Wassers überlagert.

4.6. Wasserbanden

Die Lage der OH-Valenzschwingung des Wassers in den Mischungen mit Wasser ist in Tab. 18 zusammengestellt. Die Scherenschwingung ist in diesen Mischungen mit 4 Molekülen H_2O pro Assoziat häufig von anderen Banden überlagert.

System	ν OH	δ OH
Essigsäure + Imidazol + 1 H_2O	3390	verdeckt
Essigsäure + Pyridin + 1 H_2O	3415	1640
Essigsäure + Pyridin + 2 H_2O	3405	1640
Ameisensäure + n-Propylamin + 4 H_2O	3400	verdeckt
Essigsäure + n-Propylamin + 4 H_2O	3400	verdeckt
Ameisensäure + 2-Athylimidazol + 4 H_2O	3400	verdeckt
Essigsäure + 2-Athylimidazol + 4 H_2O	3390	verdeckt
Ameisensäure + Imidazol + 4 H_2O	3400	verdeckt
Essigsäure + Imidazol + 2,4,8,16 u. 30 H_2O	3385	1647
Essigsäure + 3-Aminopyridin + 4 H_2O	verdeckt	verdeckt
Essigsäure + Pyridin + 4,8,16 u. 30 H_2O	3400	1640

Tab. 18: Banden der angelagerten Wassermoleküle

Die γ OH-Bande der Wassermoleküle tritt in allen Spektren als sehr breite Absorption um 700 cm^{-1} auf. Bei fast allen Mischungen beobachtet man bei $3200 - 3250\text{ cm}^{-1}$ an der langwelligen Flanke der ν OH-Bande (Tab. 18)

eine deutliche Schulter; ein Spektrum der Mischung von mono-deuterierter Essigsäure mit Pyridin und 4 Molekülen D_2O pro Assoziat bei ca 10 % H-Anteil zeigt diese Schulter nicht (Abb. 14). Sie ist daher wie im Fall des reinen Wassers der Oberschwingung der Scherenschwingung zuzuordnen (53 a).

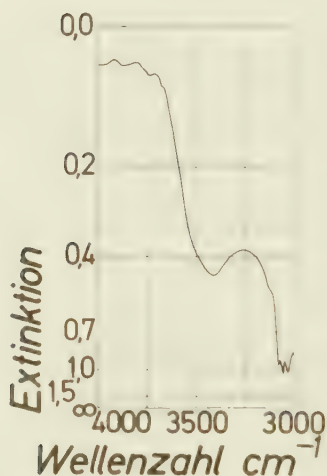


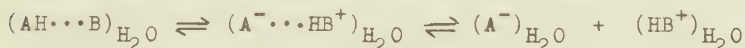
Abb. 14
IR-Spektrum von deuterierter
Essigsäure + Pyridin + 4 D_2O
mit 10 % H-Anteil

Die Lage der νOH -Bande ist nach Tab. 18 nicht sehr verschieden von der reinen Wassers bei 3425 cm^{-1} . Im System Essigsäure + Pyridin + 1 H_2O liegt diese Bande des Wassers mit 3415 cm^{-1} besonders hoch. Das zeigt eine sehr schwache Bindung an das Assoziat an und ist in Übereinstimmung mit dem fehlenden Einfluß des ersten Wassermoleküls auf den Protontransfer zu erklären. Im Fall Essigsäure + Imidazol + $n\text{ H}_2O$ sieht man an der Lage der νOH -Bande bei 3385 cm^{-1} , daß die Bindung besonders kräftig ist. Auch die Lage der Scherenschwingung ist in diesem System einige Wellenzahlen höher als in den anderen.

Neben der Stärke der Bindung von Wasser an Gruppen, die direkt an der Ausbildung der OH...N-Wasserstoffbrücken beteiligt sind, spielen für die Bandenlagen noch mehrere Effekte mit: so die Anwesenheit weiterer Wasserstoffbrückenbindungsplätze an einer zweiten funktionellen Gruppe der Base und insbesondere die Anzahl weiterer angelagerter Wassermoleküle. Für eine systematische Erfassung dieser Effekte reichen die Messungen nicht aus.

4.7. Erhöhung des Protontransfers durch Wasserzugabe

In wässriger Lösung liegt neben dem Protontransfergleichgewicht ein Dissoziationsgleichgewicht gemäß der Gleichung



vor. Dieses Gleichgewicht wird auch von Hudson et al. (4) für derartige Wasserstoffbrücken diskutiert.

Eine Übertragung des Protons auf das Wasser zu einer Anordnung $A^- \cdots \overset{H}{HOH}^+ \cdots B$ ist aufgrund der pK_a-Werte ausgeschlossen. Ebenso auszuschließen ist in hochkonzentrierten Systemen ein Aufbrechen der Wasserstoffbrücke der ungeladenen Komplexe mit Zwischemschieben von Wassermolekülen zu einer Struktur $AH \cdots \overset{H}{OH} \cdots B$, denn die in diesen

Systemen zu erwartende stark verschobene OH-Valenzschwingungsbande wird in den Spektren nicht gefunden.

Es ergeben sich zwei Fragen:

- Werden in den vorliegenden konzentrierten Lösungen die $A^- \cdots HB^+$ -Brücken schon aufgebrochen?
- Wie kann schon die Anlagerung weniger Wassermoleküle den Protontransfer in dem beobachteten Ausmaß fördern?

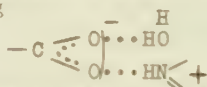
Die erste Frage wird bei der Diskussion der kontinuierlichen Absorption in 6.3. näher behandelt. Auf die zweite Frage will ich hier näher eingehen.

Bei der Erhöhung des Protontransfers sind vermutlich mehrere Mechanismen beteiligt:

- Eine Anlagerung von Wasser an die freien Elektronenpaare an der COOH-Gruppe fördert die Ablösung des Säureprotons durch die elektronenabziehende Wirkung der

Wasserstoffbrücken.

2. Die Anlagerung von Wasser an die zusätzlichen funktionellen Gruppen der Basen kann die Akzeptorstärke am basischen N-Atom beeinflussen. Da die NH- und NH₂-Gruppen Donator- und Akzeptorplätze besitzen, sind die Effekte klein. Immerhin fällt auf, daß beim 3-Aminopyridin - wie bei Überwiegen der Donatorplätze zu erwarten - die Wasseranlagerung den Protontransfer besonders fördert.
3. Die Carboxylatstruktur wird durch die Bildung einer zweiten Wasserstoffbrücke zu der Anordnung



gegenüber dem wasserfreien System symmetrischer und damit stabiler.

4. Die freie Enthalpie der Hydratation des AH...B-Komplexes ist vermutlich geringer als die des A⁻...HB⁺-Komplexes. Dabei bleibt die Zahl der Wasserstoffbrücken zum Komplex gleich, aber die Stärke und Anordnung der Brücken kann sich verändern.

Ähnliche Effekte, wie unter 1 und 3 angeführt sind, treten bei Säureüberschuß auf (54)-(56)(61). Bei 2:1-Komplexen (AH)₂·B wird in Carbonsäure-Amin-Mischungen der Protontransfer, verglichen mit 1:1-Mischungen, begünstigt. Der Effekt der Erhöhung des Protontransfers in CHCl₃ anstelle von CCl₄ (62) dürfte ebenfalls auf die zweite Brücke zurückzuführen sein.

Anlagerung weiterer Wassermoleküle

Die Vergrößerung der Hydrathülle erhöht einerseits die Wahrscheinlichkeit des dissoziierten Zustandes. Sie kann aber auch die genannten Effekte 1 bis 3 verstärken, wenn sich die Wasserstoffbrücken in Ketten von Wassermolekülen anordnen (62). Bei der Dissoziation ändert sich auch die Zahl der Wasserstoffbrücken zwischen den Ionen und dem umgebenden Wasser. Außerdem wird die Stabilisierung des dissoziierten Zustands durch die hohe Dielektrizitätskonstante des Wassers gefördert. Die Erleichterung des Protontransfers durch Erhöhung der DK des Lösungsmittels wird z.B. in den Arbeiten (4)(13)(45)(63) beschrieben.

5. Kontinuierliche Absorption

5.1. Grundlagen

In vielen IR-Spektren von Systemen mit kräftigen Wasserstoffbrücken tritt eine kontinuierliche Absorption auf, die sich häufig, beginnend bei etwa 3000 cm^{-1} , über den gesamten Grundswingungsbereich erstreckt. In (64) ist dies ausführlich behandelt. Ich will nur kurz die Ursachen ansprechen.

In Wasserstoffbrücken, die weitgehend symmetrisch sind, wenn man sie isoliert von der Umgebung betrachtet, kann sich das Proton in einem Doppelminimumpotential oder in einer flachen Mulde aufhalten. In einem Potential, wie es Abb. 15 zeigt, führt der geringe Abstand der ersten beiden Energieniveaus zu einer ungewöhnlich hohen Polarisierbarkeit.

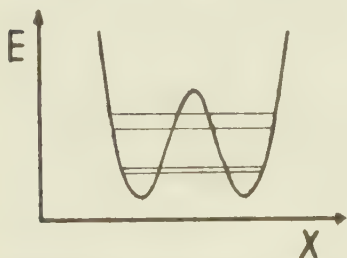


Abb. 15:
Potential mit
Doppelminimum

Diese erreicht bei H_5O_2^+ -Brücken die Größenordnung 10^{-22} cm^3 und liegt damit ungefähr zwei Größenordnungen über der gewöhnlichen Elektronenpolarisierbarkeit. Aus diesem Grund sind die Wasserstoffbrücken besonders empfindlich gegenüber Einflüssen aus der Umgebung. Die wichtigsten Einflüsse sind:

- a) Wechselwirkung mit Ionen und Solvatmolekülen über Coulomb- bzw. Dipolfelder (Induktionswechselwirkung)
- b) Wechselwirkung der Wasserstoffbrücken untereinander in erster Linie durch Induktionswechselwirkung bei geladenen Brücken und durch Protonendispersionskräfte bei ungeladenen Brücken.
- c) Kopplung der Übergänge in den Wasserstoffbrücken mit anderen Übergängen niedriger Wellenzahlen, vor allem mit der

Wasserstoffbrücken-Valenzschwingung.

Diese Wechselwirkungen sind die Ursache für die Entstehung einer Mannigfaltigkeit von Energieniveauefferenzen. Durch die statistische Mannigfaltigkeit von Abständen und Orientierungen der Wasserstoffbrücken zueinander und zu den benachbarten Ionen entsteht damit eine kontinuierliche Verteilung der Energieniveaus.

Kontinuum bei unsymmetrischen Brücken

Leicht unsymmetrische Brücken zeigen ebenfalls noch recht hohe Polarisierbarkeiten und damit Mannigfaltigkeiten der Zustände. Mit zunehmender Unsymmetrie nimmt die Polarisierbarkeit ab. Dann erstreckt sich die kontinuierliche Absorption manchmal nur über einen Teilbereich des Spektrums. So findet man bei relativ schwachen Brücken eine kontinuierliche Absorption von 3000cm^{-1} bis in die Gegend von $2000 - 1000\text{ cm}^{-1}$. Werden die Brücken noch unsymmetrischer, so beobachtet man anstelle der kontinuierlichen Absorption die Banden der AH-Gruppe in der Wasserstoffbrücke (Valenz- und Deformationsschwingung).

5.2. Kontinuierliche Absorption in den wasserfreien Systemen

In den meisten untersuchten Systemen zeigt sich im gesamten Grundschwingungsbereich zwischen 3000 und 600 cm^{-1} eine Anhebung des Spektrenuntergrundes. Diese wird durch eine kontinuierliche Absorption und damit durch leicht polarisierbare Wasserstoffbrücken verursacht (5.1.). In diesen Systemen kommen in erster Linie die $\text{OH}\cdots\text{N}$ - oder $\text{NH}^+\cdots\text{O}^-$ -Brücken zwischen Säure und Base in Frage. Die Bildung von H_2O_3^+ -Assoziaten ist im Hinblick auf die pK_a -Werte der beteiligten Gruppen nicht möglich. Die $\text{NH}^+\cdots\text{O}$ - oder $\text{OH}\cdots\text{O}$ -Brücken, die das Säureproton mit einem Wassermolekül verknüpfen könnten, wären zu unsymmetrisch.

Auswertung des Kontinuums

In den Spektren treten in der Nähe von 2200 und 1800 oder um 1400 cm^{-1} Minima in den Extinktionswerten auf. Wegen der unterschiedlichen Störungen durch die Überlagerung der breiten Banden habe ich jeweils den geringsten der Extinktionswerte im Bereich um 2250 bis 1800 cm^{-1} für die Messung der Kontinuumsextinktion verwendet. Bei der Berechnung der Extinktion habe ich die unterschiedliche Anzahl der Wasserstoffbrücken im Strahlengang durch entsprechende Korrekturfaktoren, wie in 2.6. beschrieben, berücksichtigt. Bei Anwesenheit von Wasser in den Mischungen habe ich die durch das Wasser entstehende Anhebung der Grundlinie des Spektrums abgezogen. Dazu habe ich ein Spektrum von reinem Wasser aufgenommen. Die Rechnungen erfolgen mit Hilfe sehr ähnlicher Ausdrücke wie in 2.6.

Kontinuum in Abhängigkeit vom ΔpK_a

Die Extinktion des Kontinuums ist für die wasserfreien Systeme in Abb. 17 in Abhängigkeit vom ΔpK_a aufgetragen. Spektrenausschnitte von drei Beispielen sind in Abb. 16 zusammengestellt.

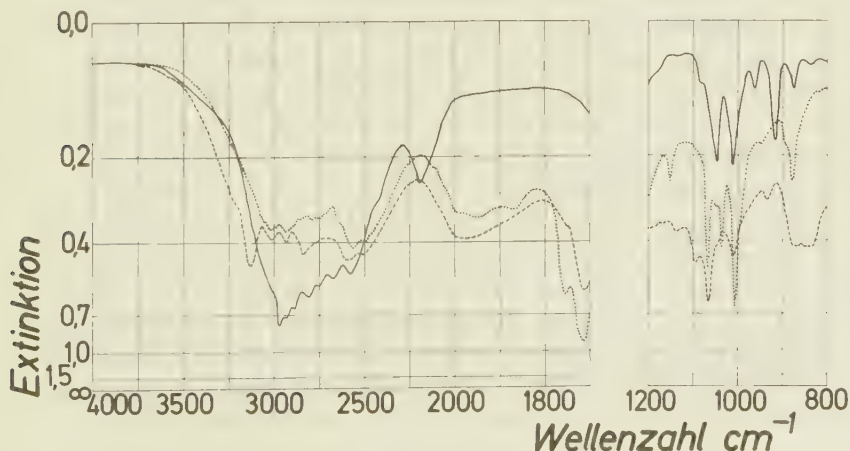


Abb. 16: IR-Spektren: — Essigsäure + n-Propylamin,
 --- Essigsäure + Imidazol, ... Essigsäure + Pyridin

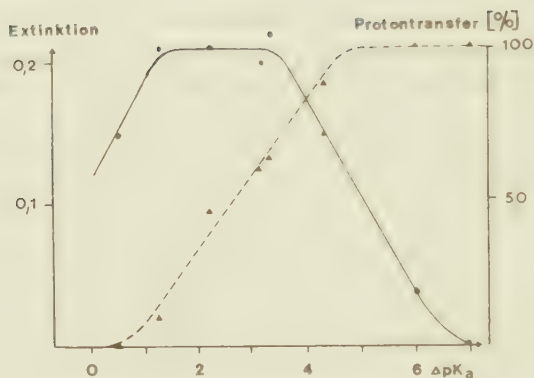


Abb. 17: Kontinuumsextinktion bei den Carbonsäure - N-Base-Assoziaten in Abhängigkeit vom ΔpK_a ——. Zum Vergleich: --- Protontransfer

In den Mischungen mit $\Delta pK_a \gg 6$ tritt kein Kontinuum auf. Das bedeutet, daß in den Mischungen mit n-Propylamin die $NH^+ \cdots O^-$ -Brücken nicht mehr leicht polarisierbar sind. Bei kleineren ΔpK_a -Werten steigt die Extinktion des Kontinuums rasch auf ein Plateau an, bei $\Delta pK_a \sim 1$ fällt die Extinktion dann wieder ab (diese Tendenz, die sich in Abb. 17 abzeichnet, habe ich an Hand der von mir aufgenommenen Spektren in (61) überprüft). Vergleicht man den Verlauf der Kontinuumsextinktion mit dem des Protontransfers in Abhängigkeit vom ΔpK_a , so stellt man einen ziemlich gut übereinstimmenden Symmetriepunkt beider Kurven fest. Darüberhinaus sieht man: bei einem ΔpK_a von 1,5 bzw. 4,5 ist das Proton in der Wasserstoffbrücke weitgehend auf einer Seite lokalisiert - entweder an der Carbonsäure oder an der N-Base -, in diesen Fällen ist die Kontinuumsextinktion gegenüber dem Maximalwert auf dem Plateau jedoch erst wenig abgefallen. Das zeigt deutlich, daß auch derartige leicht unsymmetrische Wasserstoffbrücken

noch leicht polarisierbar sind.

Abhängigkeit des Kontinuums von der Wellenzahl

Es zeigt sich, daß bei weniger symmetrischen Brücken die Extinktion des Kontinuums im allgemeinen zuerst bei kleinen Wellenzahlen abnimmt. Dies ist der Fall bei Essigsäure + Pyridin (Abb. 16) und Ameisensäure + 2-Äthylimidazol.

5.3. Einfluß des Wassers. Kontinuums-extinktion und Dissoziation

Bei der Betrachtung der Kontinuums-extinktion im Fall der hydratisierten Systeme erhält man im wesentlichen gleiche Ergebnisse wie bei der Diskussion des Protonentransfers in diesen Systemen. Darüberhinaus kann in einigen Fällen die Frage weitgehend geklärt werden, in welchem Ausmaß die Gruppierungen $BH^+ \cdots O^-$ bei Wasserzugabe dissoziieren. Die Aussagen, die nach einer Betrachtung der IR-Banden möglich waren, werden dadurch wesentlich ergänzt.

5.3.1. Kontinuum in Abhängigkeit von der Wasserzugabe

Die Abhängigkeit der Kontinuums-extinktion von der Wasserzugabe habe ich in den Systemen Essigsäure + Pyridin + $n H_2O$ und Essigsäure + Imidazol + $n H_2O$ untersucht.

In der Mischung Essigsäure + Pyridin (Abb. 18) steigt die Kontinuums-extinktion bei Zugabe von 1 bis 4 Molekülen H_2O pro Assoziat auf ein Maximum an und fällt bei weiterer Wasserzugabe wieder langsam ab. Der maximale Wert entspricht dem Wert auf dem Plateau in Abb. 17. Der Verlauf der Kontinuums-extinktion zeigt damit an, daß die Wasserstoffbrücken erst bei Zugabe von 4 Molekülen Wasser pro Assoziat weitgehend symmetrisch werden.

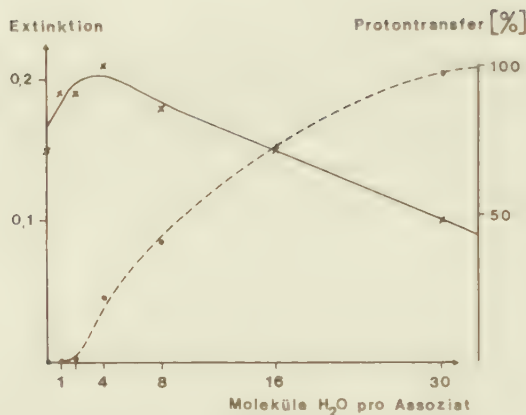


Abb. 18: Kontinuumsextinktion bei Essigsäure + Pyridin + n H₂O. Zum Vergleich: --- Protontransfer

Im Gegensatz zu den wasserfreien Systemen nimmt die Kontinuumsextinktion schon bei Anwesenheit von 50 % Protontransfer (in der Mischung mit 8 H₂O) wieder ab. Dies ist durch die einsetzende Dissoziation der Gruppierungen mit den leicht polarisierbaren NH⁺...O⁻-Brücken zu erklären. Vergleicht man weiter die Abb. 18 und 19, so sieht man, daß bei 75 % Protontransfer im System Essigsäure + Imidazol + 3 H₂O noch maximales Kontinuum vorhanden ist, während im System Essigsäure + Pyridin + 16 H₂O das Kontinuum schon auf 2/3 des Maximalwertes gesunken ist. Der Unterschied kann wieder auf die Dissoziation zurückgeführt werden. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, daß in den Mischungen von Essigsäure mit Pyridin und Wasser der Abfall der Kontinuumsextinktion nicht durch eine fortschreitende Unsymmetrie der Brücken verursacht wird, sondern im wesentlichen durch die Dissoziation begründet ist. Danach sind in der Mischung mit 30 H₂O gerade 50 % der Gruppierungen dissoziiert.

Im System Essigsäure + Imidazol + n H₂O (Abb. 19) ist die Kontinuumsextinktion durch Zugabe der ersten zwei Wassermoleküle nicht beeinflusst. Mit weiterer Wasserzugabe fällt die Extinktion ab, und zwar etwas schneller als in den Mischungen mit Fyridin; ein entsprechender Unterschied liegt beim Verlauf des Protontransfers vor.

Bei Anwesenheit von 4 Molekülen H₂O pro Assoziat hat man etwa 90 % Protontransfer - also weitgehende Lokalisation des Protons an der N-Base - und dabei noch fast maximales Kontinuum. Das entspricht den Verhältnissen in den wasserfreien Systemen. Daraus ist zu schließen, daß bei Gegenwart von 4 H₂O noch fast keine Gruppierung dissoziiert ist. Darüber hinaus sieht man aus der Kontinuumsextinktion bei Zugabe von 30 H₂O, daß auch in diesem System noch nicht alle Gruppierungen dissoziiert sind.

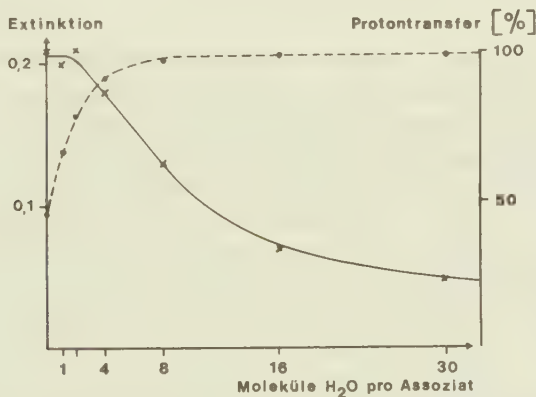


Abb. 19: Kontinuumsextinktion bei Essigsäure + Imidazol + n H₂O. Zum Vergleich: --- Protontransfer

5.3.2. Kontinuum in den Mischungen mit 4 Molekülen H₂O pro Assoziat

Die Extinktion des Kontinuums ist in Abb. 20 in Abhängigkeit vom ΔpK_a mit und ohne Anwesenheit von Wasser dargestellt

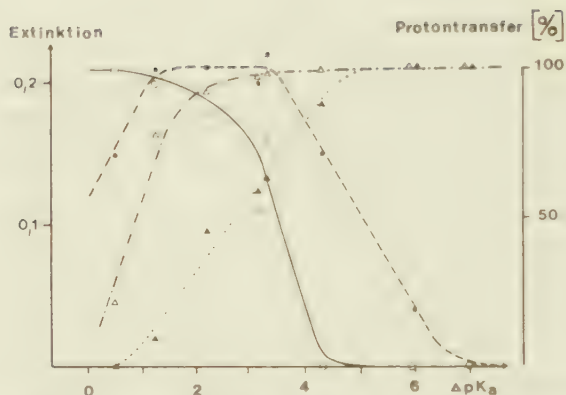


Abb. 20: Kontinuumsextinktion in den Systemen Carbonsäure + N-Base + 4 H₂O in Abhängigkeit vom ΔpK_a —. Zum Vergleich: --- Protontransfer in diesen Systemen; ---Kontinuumsextinktion und.... Protontransfer in den wasserfreien Assoziaten.

Wenn Wasser in den Systemen anwesend ist, erhält man eine ähnliche Abhängigkeit der Kontinuumsextinktion vom ΔpK_a wie in den wasserfreien Systemen. Die Werte der beiden Plateaus stimmen weitgehend überein (Abb. 19). Lediglich der maximale Wert der Kontinuumsextinktion für derartige H···N-Brücken unabhängig von der Anwesenheit von Wasser. In der Darstellung des Protontransfers in Abhängigkeit vom ΔpK_a ohne und mit 4 H₂O sind die beiden Kurven um $\Delta pK_a = 1,5$ gegeneinander verschoben. Dies ist in Abb. 20 noch einmal zu sehen. In sehr ähnlicher Weise sind auch die Kurven, die die Kontinuumsextinktion in Abhängigkeit vom ΔpK_a zeigen, um etwa den gleichen ΔpK_a -Wert gegeneinander verschoben. In beiden Fällen kommt zum Ausdruck, wie die Symmetrie des Potentials in der Wasserstoffbrücke durch die Wasserrugabe verändert wird. Damit wird der Schluss aus der Lage der IR-Banden bestätigt, daß in den Systemen mit 4 H₂O noch keine Dissoziation der der Gruppierungen auftritt, denn dieser Effekt müßte die Kontinuumsextinktion zusätzlich vermindern.

5.4. Gibt es andere Assoziate, die das Kontinuum verursachen?

Szafran (65) nimmt in reinen flüssigen Mischungen von Carbonsäuren mit Aminen ein Gleichgewicht $2(\text{AH}\cdots\text{B}) \rightleftharpoons (\text{AHA})^- + (\text{BHB})^+$ an. In (37) ist vermutet, daß dies auch in Mischungen mit den von mir untersuchten N-Basen auftritt. Eine derartige Annahme erschien damals für die Erklärung der Befunde plausibel, da es noch nicht bekannt war, daß auch relativ unsymmetrische Wasserstoffbrücken recht intensive IR-Kontinua verursachen. Die Rechnungen (66) und experimentelle Ergebnisse haben dies jedoch gezeigt. Da die kontinuierliche Absorption über einen beträchtlichen Bereich des Δp_k und auch bei Zugabe von 4 Wassermolekülen ein konstantes Ausmaß hat, ist ausgeschlossen, daß die AHA^- und BHB^+ -Brücken in erster Linie zum Kontinuum beitragen, denn das obige Gleichgewicht wäre in den verschiedenen Systemen in unterschiedlichem Ausmaß verschoben. Weiter zeigen die Vergleiche mit IR-Spektren in (67), daß bei AHA^- -Komplexen, die intensive Kontinua verursachen, die $\nu\text{C=O}$ -Bande der Essigsäure unterhalb von 1700 cm^{-1} zu erwarten wäre. In den vorliegenden Mischungen finde ich jedoch keine derartige Bande. Aus diesen Ergebnissen ist zu sehen, daß die $\text{OH}\cdots\text{N}$ -Brücken - wie im vorangegangenen stets diskutiert - die wesentliche Ursache für das Kontinuum sind.

5.5. Kontinuum und ABC-Banden

Sowohl die kontinuierliche Absorption wie die ABC-Banden werden von den fast symmetrischen Wasserstoffbrücken verursacht. Die Voraussetzungen für die beiden Effekte sind die leichte Polarisierbarkeit der Brücken einerseits und die Anharmonizität der Potentiale andererseits. Bei unsymmetrischen Potentialen können diese Voraussetzungen leicht gleichzeitig auftreten.

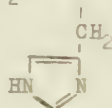
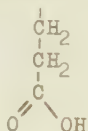
Über die Potentialformen und Anharmonizitäten in derartigen fast symmetrischen Wasserstoffbrücken liegen keine Arbeiten vor, wie es bei schwächeren Wasserstoffbrücken der Fall ist (67a). Andererseits sind in den theoretischen Arbeiten zur kontinuierlichen Absorption (s.64) Deformationsschwingungen in den Wasserstoffbrücken - und damit die Fermiresonanz mit diesen - nicht berücksichtigt. Es ist aber wahrscheinlich, daß in vielen Fällen die entsprechenden Oberschwingungen mit Übergängen, die zum Kontinuum beitragen, koppeln können. Diese Kopplung könnte durch Fermiresonanz dem Kontinuum die beobachtete Struktur aufprägen. Auf diese Weise ist eine einheitliche Beschreibung der beiden Effekte möglich.

Teil B: Assoziatv n Poly-L-Glutaminsäure mit N-Basen
und Poly-L-Histidin mit Carbonsäuren

6. Zusammenstellung der Systeme und Spektrentabelle

Poly-L-Glutaminsäure (PLG) bildet mit monomeren N-Basen und Poly-L-Histidin (PLH) mit monomeren Carbonsäuren im Mischungsverhältnis 1 Molekül Monomere pro Seitenkette Assoziat. Diese habe ich in Form lösungsmittelfreier Filme wasserfrei und hydratisiert untersucht. Außerdem habe ich die Mischungen mit 30 Molekülen H_2O pro Seitenkette untersucht und bei den Assoziaten PLG - Imidazol und PLH - Essigsäure auch Mischungen mit 16 und 8 H_2O .

Glutaminsäure-
rest

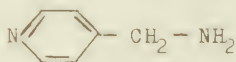


Histidin-
rest

Die pK_a -Werte der Aminosäurereste in den Polypeptiden sind 4,45 im Fall der PLG (61) und 6,15 im Fall des PLH (62). Die angegebenen Werte sind in der Literatur als pK_o -Werte bezeichnet. Die pK_a -Werte, als pH bei Halbprotonierung gemessen, sind 4,69 bei PLG und 5,9 bei PLH. Diese Werte sind auch abhängig von der Sekundärstruktur (70). Die pK_o -Werte sind aus Titrationskurven extrapoliert und beziehen sich auf Gruppen, deren benachbarte Gruppen noch nicht dissoziiert sind. Dabei tritt also noch keine elektrostatische Wechselwirkung zwischen benachbarten geladenen Gruppen auf.

In den vorliegenden Systemen treten beim Protontransfer keine isolierten Ladungen auf. Die Ladungen sind vielmehr durch die über starke Wasserstoffbrücken verbundenen Gegenionen weitgehend kompensiert. Daher scheint der pK_o -Wert, den ich im folgenden immer als pK_a -Wert bezeichne, als Maß geeigneter, wenn mit den pK_a -Werten der Monomeren verglichen wird.

Für die Anlagerung an die Polymeren habe ich die gleichen monomeren Säuren und Basen verwendet wie in Teil A, zusätzlich das Picolylamin



, pK_a 9,65,

Monochloressigsäure, pK_a 2,86, Dichloressigsäure, pK_a 1,48, Trichloressigsäure, pK_a 0,7, (pK_a -Werte aus (27)) und Trifluoressigsäure, pK_a 0,23 (aus (71)). In Tab.19 habe ich die untersuchten Systeme mit den ΔpK_a -Werten zusammengestellt.

System	ΔpK_a	Spektrum in Abb.
PLG - n-Propylamin	6,25	39
PLG - Picolylamin	5,2	39
PLG - 2-Äthylimidazol	3,6	39
PLG - Imidazol	2,5	37
PLG - 3-Aminopyridin	1,53	39
PLG - Pyridin	0,8	39
PLH - Trifluoressigsäure	5,92	50
PLH - Trichloressigsäure	5,45	50
PLH - Dichloressigsäure	4,67	50
PLH - Monochloressigsäure	3,29	49
PLH - Ameisensäure	2,4	49
PLH - Essigsäure	1,4	46

Tab. 19 : Zusammenstellung der untersuchten Systeme

7. Experimentelles

7.1. Substanzen

Die Polyaminosäuren sind von der Firma Miles-Yeda, Rehovot/ Israel, hergestellt. Das Molekulargewicht beträgt für das PLG 35000, für das PLH 11000. Bei den Proben liegt die neutrale Säure bzw. Base vor, dies sieht man aus den IR-Spektren. Je eine Probe habe ich in einer Apparatur der Firma Sartorius, Göttingen, durch Elektrodialyse gereinigt. Dabei habe ich Filter mit einem Porendurchmesser von 5nm verwendet. Die Spektren der dialysierten Substanzen waren von denen der undialysierten nicht zu unterscheiden. Die monomeren Säuren und Basen, die in Teil A noch nicht erwähnt sind, wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen unter Reinheit p.a. .

Die Polymerproben habe ich zwei Tage bei 10^{-2} Torr über einer Kohlfalle mit flüssiger Luft getrocknet. Das bei dieser Prozedur verdampfende Wasser (weniger als 0,5 Gew.%, vgl. Kap. 5.3.) habe ich bei der Einwägung berücksichtigt. Bei den Monomeren habe ich ebenfalls im IR-Spektrum oder durch Titration festgestellte Wasseranteile berücksichtigt.

7.2. Herstellung der Filme

Die Filme habe ich aus verdünnten wässrigen Lösungen auf Probenträgern eingetrocknet. In der Konzentration n mg Polypeptid pro ml ist PLG bei aquivalenter Zugabe der N-Basen spätestens nach 48 Stunden Rütteln bei Zimmertemperatur vollständig gelöst. Das gleiche gilt für PLG mit den Carbonsäuren.

Aquivalente Zugabe: Bei allen Mischungen soll die Menge der monomeren Moleküle der Menge der Aminosäurereste entsprechen. Wenn man die endliche Kettenlänge berücksichtigt, erhält man für die Rechnungen als korrigiertes Molekulargewicht

$$M' = M_A - M_{H_2O} \left(1 - \frac{1}{K} \right)$$

mit M_A Molekulargewicht der Aminosäure, K Anzahl der Aminosäurereste pro Kette.

Filme von neutraler PLG und PLH habe ich durch Eintrocknen aus pyridin- bzw. essigsäurehaltigen wässrigen Lösungen erhalten. Um reproduzierbare Verhältnisse zu erreichen, habe ich die Filme anschließend bei hoher Luftfeuchtigkeit mehrmals rehydratisiert und scharf getrocknet.

Probenträger

Als Probenträger dienten Germaniumscheiben aus polykristallinem p-dotierten Germanium (Spezifikationswert 10^{-4} cm^{-1}) mit aufgeklebtem Rahmen aus Laborglas. In den meisten Fällen verwendete ich zum Kleben einen 2-Komponenten Epoxidharzkleber mit hohem Feststoffanteil (Isamet R 3, Isarchemie, München). Für die Proben, die den Ameisensäure- und Essigsäuredämpfen ausgesetzt waren, stellte ich einen Säurekitt

nach einer Vorschrift aus (72) her. Die Poren mußten noch mit flüssigem 2-Komponentenkleber mit Hilfe von Druckluft und Vakuum verschlossen werden. Um die Germaniumscheiben habe ich einen Ring aus Edelstahl geklebt, der die Fläche für das Aufkleben des Rahmens vergrößerte und die Stabilisierung beim Eintrocknen verbesserte. Für die bessere Haftung der Filme auf der Oberfläche habe ich diese kurz mit H_2O_2 angeätzt.

Eintrocknen der Proben

Das Eintrocknen nahm ich nach einem Verfahren von Hofmann und Zundel (73) in einer thermostatisierbaren Zentrifuge vor. Dabei wird der Probenträger zusammen mit einem Trocknungsmittel (meistens $CaCl_2$) in einen Spezialbehälter gebracht, wo er auf einer Quecksilberoberfläche schwimmt. Auf der Oberseite des Probenträgers ist eine zylinderförmige Vertiefung mit dem Radius der Zentrifuge eingeschliffen. Die Probenmenge beträgt je nach Tarierung der Träger 1,2 - 2 mg Polypeptid.

7.3. Küvetten zur Aufnahme der Filmspektren

Die Probenträger mit den Filmen wurden in Spezialküvetten eingesetzt. Die Küvetten sind evakuierbar und erlauben es, eine definierte Luftfeuchtigkeit einzustellen. Als Fenstermaterial ist KRS-5 verwendet. Ähnliche Küvetten waren aus Messig- und Glasteilen zusammengesetzt vorhanden, sie sind in (53) beschrieben. Wegen der Verwendung der flüchtigen Säuren und N-Basen waren die Messingküvetten jedoch nicht geeignet. Ich habe daher Küvetten aus Edelstahl konstruiert unter Verwendung von Kleinflansch-Vakuum-Bauteilen der Firma Leybold-Heraeus, Köln. Den Aufbau einer derartigen Küvette zeigt die Abb. 21 .

Kernstück, Fensterflansche und Ventile sind aus Bauteilen der Serie KF 50 und KF 10. Die Fenster sind mit 2-Komponentenkleber aufgekittet. An die Kleinflanschansätze habe ich zur Feuchtigkeitseinstellung (Kap. 7.4.) Vorratsbehälter für Salzlösungen über ein Eckventil angeschlossen. (Abb.21 b). Ein Anschluß für einen weiteren Vorratsbehälter

erlaubt die Bedampfung mit Säure oder Base. Anstelle der Vorratsbehälter können Schläuche angeschlossen werden, dann kann die Küvette mit Dämpfen durchströmt werden. Auf die Oberseite der Küvette ist eine Olive aufgeschweißt. Von ihr führt ein PVC-Vakuumschlauch zu einem Glashahn, über den sie evakuiert werden kann. Die Küvette ist vollständig demon- tierbar. Die Halterung der Probenträger ist aus Teflon, sie wird zwischen Fensterflansch und Zentrierring eingeklemmt.

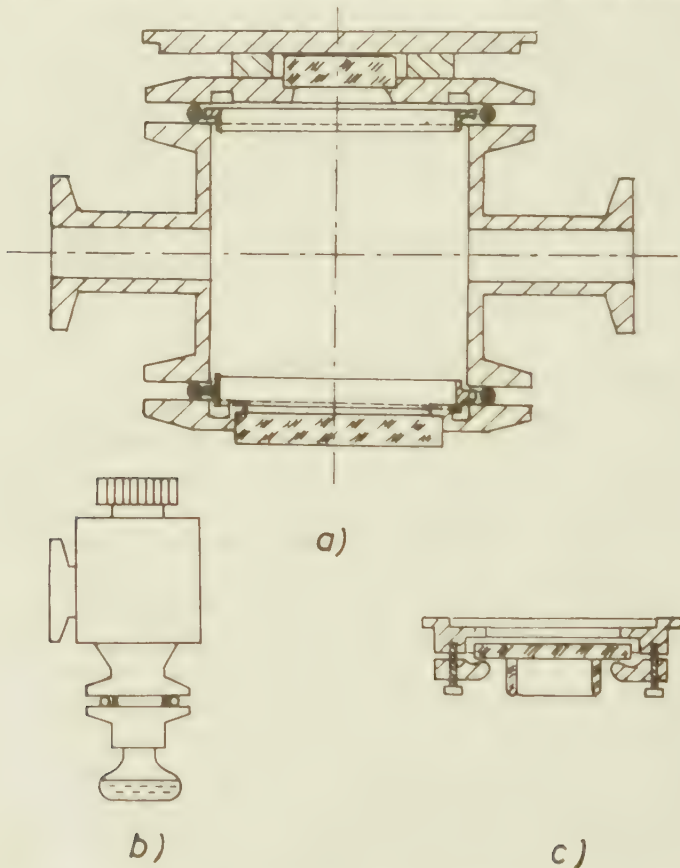


Abb. 21: Küvette a) Kernstück und Fensterflansche, Flansch- klammern weggelassen b) Eckventil und Vorratsbe- hälter, verkleinert c) Probenträger mit Halterung

Thermostatisierung

Die Küvetten mit den Proben bewahrte ich vor der Messung in einem Thermostatschrank bei 25°C auf. Während der Aufnahme der Spektren wurde durch eine thermostatisierbare Abschirmung die Temperatur der Küvette konstant gehalten. Diese Abschirmung besteht aus Kupferblech mit einer aufgelöteten Kupferrohrschlange, sie läßt nur den Strahlengang frei. Nach außen hin ist die Abschirmung isoliert. Die Temperatur der Küvette habe ich über einen Platin-Thermofühler kontrolliert.

Kurzwegküvetten

Bei der Bedampfung des PLH mit Essigsäure muß wegen der geringen Assoziationskonstante der Dampfdruck über dem Film so hoch sein, daß die Dampfbanden schwer zu kompensieren sind. Für diese Spektren habe ich eine Küvette mit nur 1,5 cm Weglänge durch den Dampfraum konstruiert (Abb. 22). Die Abmessungen reichen gerade für den Probenträger aus. Damit die Diffusion der Dämpfe in den Raum zwischen Probenträger und kleinem Fenster möglichst rasch erfolgt, sind in den vorderen Flansch Nuten gefräst. Die Dampfzuführungen sind kurze Stahlrohre, auf die Glashähne aufgekittet oder Schläuche aufgesteckt werden können. Im übrigen entsprechen die Fenster-Teile weitgehend denen der größeren Küvetten. Zur Thermostatisierung sind auf die Flanschklammern (nicht dargestellt) Kupferrohre aufgelötet:

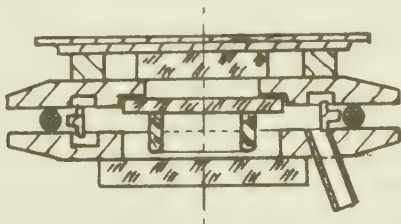


Abb. 22: Kurzwegküvette, Flanschklammern weggelassen

7.4. Hydratation und Deuterierung

Zur Einstellung der Luftfeuchtigkeiten habe ich wie in (53c) beschrieben gesättigte wäßrige Lösungen verschiedener Salze verwendet. Dazu wurden die Küvetten mit angeschlossenem Salzlösungsbehälter vorsichtig evakuiert und mindestens 12 Stunden (s. Kap. 8.3.) in einem auf 25°C thermostatisierbaren Raum aufbewahrt. Die Luftfeuchtigkeit stellt sich über den Salzlösungen wie folgt ein (74)(27):

<u>Salz</u>	<u>rel. Luftfeuchtigkeit (%)</u>
$K_2Cr_2O_7$	98,0
$BaCl_2 \cdot 2H_2O$	90,2
$SrCl_2 \cdot 6H_2O$	70,8
$K_2CO_3 \cdot 2H_2O$	42,8
$MgCl_2 \cdot 2H_2O$	33,0
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	30,5
$LiCl$	11,5

Bei der größten Feuchtigkeit wurde in Adsorption gemessen und bei den anderen Feuchtigkeiten in Desorption, wenn nichts anderes bemerkt ist.

Deuterierung

Bei Verwendung entsprechender deuterierter Salzlösungen läßt sich wie in (53c) beschrieben ein H-D Austausch bezüglich des Hydratwassers und der leicht austauschbaren OH und NH-Gruppen vornehmen.

7.5. Vorgehen bei flüchtigen Säuren und Basen

Bei den Messungen stellte sich heraus, daß in den Systemen ohne Protontransfer die jeweiligen Monomeren nur wenig kraftig von den Polyaminosäuren festgehalten werden. Die Folge davon ist, daß ein Film aus PLH und Essigsäure oder PLG und Pyridin nach dem Eintrocknen kaum noch Essigsäure bzw. Pyridin enthält. Sogar aus den PLG-Propylamin-Filmen ist ein Teil des Propylamins desorbiert. Das Problem besteht also bei allen Monomeren mit hohem Dampfdruck.

Bei der Untersuchung solcher Systeme ging ich folgendermaßen vor: Zunächst trocknete ich nach dem üblichen Verfahren den Film aus der Lösung ein. Dann brachte ich die Monomeren - manchmal gleichzeitig mit dem Wasser zur Hydratation - über die Dampfphase wieder in den Film. Für die Bedampfung habe ich mehrere Verfahren erprobt, die im folgenden beschrieben sind. Die Anwesenheit im Film konnte ich durch verschiedene Methoden nachweisen, diese sind in Kap.7.5.2. dargestellt.

7.5.1. Einstellung des Säuren- oder Basengehalts der Filme

7.5.1.1. Strömungsmethode

Bei der Strömungsmethode (Schema der Anordnung siehe Abb. 23) Wird ein Strom getrockneter und gereinigter Luft mit Säure bzw. Base beladen, ein anderer mit Wasser. Die Beladung geschieht in thermostatisierten Frittenverdampfern, die mit der entsprechenden Flüssigkeit gefüllt sind.

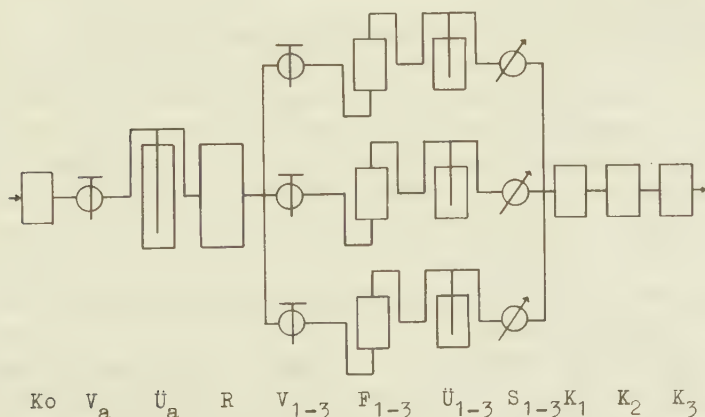


Abb. 23: Strömungsverfahren

Ko Kompressor, V Regelventile, Ü Flüssigkeitsüberdruckventile, R Luftreinigungs- und Trocknungsapparatur, F Frittenverdampfer, S Strömungsmesser, K Küvetten

Die gesättigten Dämpfe werden vereinigt und gegebenenfalls mit einem Luftstrom verdünnt (F_2 dient dabei nur zum Druckausgleich) . Durch die Variation der relativen Strömungsgeschwindigkeiten kann man verschiedene Partialdrücke einstellen. Die Mischung der Ströme wird dann durch die Küvette und eine Vergleichsküvette geleitet. Mit Hilfe einer dritten Küvette mit großer Weglänge kann die Dampfbzusammensetzung über IR-Banden kontrolliert werden. Die Schwierigkeit bei diesem Verfahren ist, die Strömungsgeschwindigkeiten konstant zu halten. Ich habe dies über mehrere Flüssigkeitsüberdruckventile erreicht. Diese wurden durch Regelventile so angesteuert, daß sie gerade in Funktion traten und dadurch die Druckverhältnisse und damit die Strömungsgeschwindigkeiten konstant hielten. Das Überdruckventil U_a ist eine 2 bis 3 m hohe Wassersäule, die anderen Ventile sind 10 bis 70 cm hoch mit denselben Flüssigkeiten gefüllt wie die Frittenverdampfer vor ihnen. Die Strömungsgeschwindigkeiten habe ich mit Hilfe von Kapillaren gemessen, an denen ich den Druckabfall über Flüssigkeitsmanometer kontrolliert habe (Riesenfeldscher Strömungsmesser (75)).

Die Anordnung lieferte gute Ergebnisse, sie hatte jedoch einige Nachteile: Ihre Einregelungszeit betrug 1 bis 2 Stunden, bis sich ein konstanter Dampfdruck in der Küvette eingestellt hatte. Ferner benötigt die Anordnung große Substanzmengen, was insbesondere bei giftigen Substanzen unangenehm ist.

7.5.1.2. Variation des Dampfdruckes mit Mischungsverhältnis und Temperatur

Apparativ einfacher ist die Methode, Mischungen der Säure bzw. Base mit Wasser herzustellen und die Partialdrücke durch Variation der beiden Parameter Mischungsverhältnis und Temperatur einzustellen. Der Aufbau ist in Abb. 24 dargestellt. Die Anordnung wird evakuiert, dadurch sind die Diffusionszeiten sehr kurz.

Dieses Verfahren hat den Nachteil, daß die Partialdrucke der meisten Mischungen zunächst unbekannt sind. Da jedoch in meiner Arbeit nicht diese, sondern die Beladung der Filme mit Säure, Base und Wasser interessierte, wendete ich bevorzugt diese Methode an.

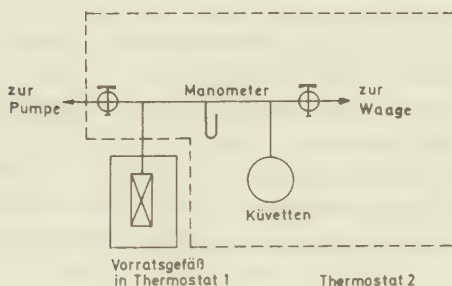


Abb. 24: Anordnung zur Einstellung des Säure- und Basengehaltes der Filme

7.5.1.3. Kondensation auf die Filme

Bei den oben beschriebenen Methoden stören die meist kleinen Adsorptionsgeschwindigkeiten (Kap.8.5.). Denn bei Einwirkung der Dämpfe von mehr als einem Tag wurden die Klebungen der Küvettenfenster und Probenträger angegriffen. Propylamin und Pyridin waren dabei besonders aggressiv. Aus diesem Grund nahm ich die Bedampfung der PLG-Filme mit den Basen nicht in der Küvette, sondern in einem Exsiccator vor. Ich kühlte dabei den Probenträger unter Zimmertemperatur vor und stellte neben ihn in den Exsiccator ein offenes Gefäß mit der Base. Bei Anlegen eines Vakuums kondensiert die Base in dünner Schicht auf dem Film.

Die adsorbierte Menge habe ich durch IR-Banden kontrolliert und das Verfahren habe ich entsprechend wiederholt. Vor der Aufnahme der endgültigen Spektren habe ich den Probenträger 1. Stunden in einem mit trockener Luft gefüllten Exsiccator stehen lassen, um eine gleichmäßige Verteilung der Base abzuwarten. Bei Pyridin habe ich den Film über der flüssigen Base stehen lassen und anschließend das an der Oberfläche adsorbierte Pyridin durch Anlegen von Wasserstrahlvakuum von einigen Minuten Dauer entfernt.

Das Aufkondensieren hat jedoch ebenfalls Nachteile:

1. Bei der Nachbedampfung der Histidinfilme muß man bei dieser Methode sehr vorsichtig vorgehen, um keine Strukturumwandlungen zu verursachen, wie sie bei Säureüberschuß auftreten. 2. In einem PLG-Propylaminfilm wird eine β -Struktur des Rückgrats auch bei vorsichtiger Bedampfung zerstört. Beides wird durch die zunächst vorhandene höhere Konzentration von Säure bzw. Base in den oberen Filmschichten verursacht.

7.5.2. Kontrolle der Anwesenheit von Säure und Base

Die Anwesenheit von Säure und Base kann an Hand der IR-Banden kontrolliert werden. Für eine quantitative Absolutberechnung ist hierzu jedoch eine Eichung mit einer anderen Methode notwendig. Diese Eichung habe ich folgendermaßen durchgeführt: Ich habe je zwei Filme nach der Aufnahme eines IR-Spektrums in Wasser aufgelöst; bei den Systemen PLH - Säure und PLG - n-Propylamin habe ich die Lösung potentiometrisch titriert, bei PLG - Pyridin und PLG - 4-Aminopyridin den Basengehalt über die UV-Banden bestimmt.

7.5.2.1. Potentiometrische Titration

Den pH-Wert habe ich mit einem Potentiometer der Firma Metrohm, Herisau, und mit einer Glaselektrode mit flacher

Membran von der gleichen Firma gemessen. Die Elektrode erlaubt die Messung in weniger als 0,5 ml Lösung direkt in den Probenträgern. Bei der Titration verwendete ich 0,1 N Elektrolytlösung, eine Bürette mit 0,01 ml Unterteilung und zur Dosierung ein Magnetventil (Titrostop, Fma. Klees, Düsseldorf). Zur Mischung bewegte ich den Probenträger gegenüber der Elektrode hin und her. Die Messungen habe ich mit Eichtitrationen überprüft.

PLH - Säure-Filme: Diese Filme habe ich mit einer abgemessenen Menge überschüssiger Säure aufgelöst und die Gesamtmenge der Säure mit 0,1 N NaOH zurücktitriert.

PLG - n-Propylamin-Filme: In den Filmen mit weniger als 100 % n-Propylamin-Gehalt konnte ich unter sorgfältigem Rühren die von der Base nicht abgesättigten Glutaminreste durch Titration mit NaOH bestimmen. Dabei muß man darauf achten, daß sich der Film vollständig auflöst.

7.5.2.2. UV-Banden

Die Bestimmung über die UV-Banden hat den Vorteil, daß der PLG-Film mit verdünnter NaOH aufgelöst werden kann, ohne die Messung zu beeinträchtigen. Zur Messung stand ein UV-Spektrometer PM-Q2 der Firma Zeiss, Oberkochen, zur Verfügung. Ich habe 0,5 cm Quarzküvetten benutzt und eine Konzentration von 5×10^{-5} M. Bei Pyridin habe ich die Absorption bei 253 nm gemessen, beim Aminopyridin bei 288 nm, beide gegen eine Lösung von PLG - NaOH. Zur Auswertung habe ich mit Eichlösungen eine Eichkurve aufgestellt.

7.6. Messungen in Lösung

Herstellung der Lösungen: Zunächst habe ich eine Mischung von 1 Mol Säure bzw. Base mit 30 Mol Wasser hergestellt und von dieser Mischung die entsprechende Menge (1 Mol Säure bzw. Base pro Peptidrest) zu ca 5 - 7 mg Polypeptid gegeben und 1 - 3 Tage bei Zimmertemperatur gerüttelt. Dabei löste

sich das Polypeptid mit Ausnahme der Systeme PLH - HCl, PLH - Trifluoressigsäure und PLH - Trichloressigsäure. Bei diesen Systemen habe ich deshalb die Salze aus verdünnter wässriger Lösung gefriergetrocknet und dann das Wasser zugegeben. PLH - HCl löst sich gut, PLH - Trichloressigsäure löst sich bei ca. 60°C, während PLH - Trifluoressigsäure mit 30 H₂O bis über 90°C eine trübe hochviskose Suspension bildet.

Die Mischungen PLG - Imidazol mit 16 H₂O und 8 H₂O habe ich 3 Tage bei 40°C gerüttelt. Sie bilden klare, homogene, sehr viskose Pasten.

Die Mischungen PLH - Essigsäure + nH₂O wurden bereits nach 2 Stunden heftigen Rüttelns bei Zimmertemperatur homogen.

Flüssigkeitsküvette: Für die Aufnahme der Spektren der Lösungen und Pasten habe ich die gleiche Küvette verwendet wie bei den Modellsystemen in Teil A. Ich habe diese mit 10 µl Flüssigkeit gefüllt, wenn sich die Lösung pipettieren ließ; die erwähnten hochviskosen Mischungen habe ich mit einem Spatel aufgetragen. In den letzteren Fällen ist die Schichtdicke - gegenüber der von 0,2 µ bei Flüssigkeiten - wesentlich vergrößert. Die Fehler wurden bei der Auswertung korrigiert. Bei einem sorgfältigen dünnen Aufstreichen oder bei Erwärmung zur Reduzierung der Viskosität hatte die Gefahr bestanden, daß Säure, Base oder Wasser entweichen.

7.7. Aufnahme der Spektren

Spektrometer und Einstellung bei Aufnahme der Spektren ist analog zu Teil A. Bei der Aufnahme der Filmspektren war wegen des dritten Fensters im Strahlengang die Verstärkung entsprechend höher eingestellt. Bei Kompensation von H₂O-Banden bei über 90 % Luftfeuchtigkeit und von Säurebanden habe ich mit kleinerer Vorschubgeschwindigkeit und Zeitkonstante 3 gearbeitet.

7.7.1. Vergleichsküvetten

Bei der Aufnahme der Filmspektren werden die Vergleichsküvetten nicht nur zur Kompensation von Reflexion und Absorption der Fenstermaterialien benötigt, sondern auch zum Ausgleich der Absorption der Dämpfe (H_2O , D_2O und Säuren bzw. Basen). Die Vergleichsküvetten sind daher ebenso aufgebaut wie die Meßküvetten. Für die Messungen mit hohem Dampfdruck (Ameisensäure und Essigsäure) befand sich die Vergleichsgermaniumscheibe in der Küvette. Die Nulllinien der Anordnung ohne Probe wurden mehrfach überprüft und gegebenenfalls durch Polieren der Scheiben verbessert.

7.7.2. Streuung an den Filmoberflächen

Ein großes Problem bildete bei der Aufnahme der Spektren die wellenzahlabhängige Streuung an den Filmen. Zum Ausgleich dieser Streuung habe ich die Oberfläche der Vergleichsgermaniumscheiben mit Diamantpasten oder Polierpapier vor-sichtig aufgeraut. Dabei stellt sich eine entsprechende Streuung ein, die durch Kompensation zu einer weitgehend geraden Grundlinie führt. Eine kontinuierliche Absorption im gesamten Spektralbereich läßt sich nach diesem Vorgehen jedoch nicht mehr quantitativ auswerten.

8. Weitere Vorarbeiten: Sorptionswägungen an Polyamino-säurefilmen

Bei zwei Proben, einem PLH-Film und einem PLG-Na-Film, habe ich mit einer Quarzfederwaage die Adsorption von H_2O bei 92 % relativer Luftfeuchtigkeit in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt. Entsprechend bin ich bezüglich der Desorption bei Trocknung mit einer Kühlfalle mit flüssiger Luft bei ca. 10^{-3} Torr vorgegangen. Beim PLG-Na-Film habe ich außerdem eine Desorptionsisotherme aufgenommen. Über den Vergleich der Intensitäten von Wasser- und Amidbanden habe ich die

Hydratation in den anderen Systemen abgeschätzt.

8. 1. Bau einer Adsorptionswaage

Hierzu habe ich eine Quarzfederwaage in einem Glasrohr aufgebaut. Sie ist in Abb. 25 dargestellt.

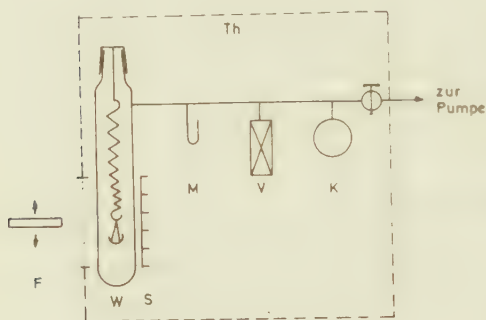


Abb. 25:

Adsorptionswaage

- F Fernrohr
- W Waage
- M Manometer
- V Vorratsbehälter
- K Küvette
- Th Thermostatkasten
mit Fenster
- S Spiegelskala

Die Quarzfeder hat eine Empfindlichkeit von $4,25 \text{ mm/mg}$. Die Ablesegenauigkeit beträgt $0,05 \text{ mm}$ mit dem Kathetometer; Bei rascher Änderung der Adsorption habe ich mit einer Lupe abgelesen, dabei beträgt die Ablesegenauigkeit etwa $0,1 \text{ mm}$. Zur Aufnahme der Filme hängt an der Quarzwendel eine 2 cm^2 große Schale aus Teflonfolie von weniger als 20μ Dicke. Die Folie ist über einem heißen Glaskolben zu einer Schale geformt. Die Schale hängt an dünnen Perlonfäden, das Gesamtgewicht dieser Anordnung beträgt 12 mg . Die Waage befindet sich zusammen mit dem Salz Lösungsvorratsgefäß in einem Thermostatkasten. Dieser hat ein Fenster zur Ablesung der Skala.

8.2. Trägerfreie Probefilme

Im Wesentlichen habe ich zur Herstellung das gleiche Verfahren angewendet, das in 7.2. beschrieben ist. Abweichend davon habe ich auf den Germanium-Probenträger eine genau in den Rahmen passende Teflonfolie von $25\text{ }\mu$ Dicke gelegt und statt $1,4\text{ mg}$ etwa 6 mg Polypeptid in wäßriger Lösung mit Säure bzw. Base aufgetragen. Nach dem Eintrocknen befindet sich auf dem Teflon ein Film von etwa der doppelten Dicke wie bei den spektroskopierten Filmen (der Film hat auch eine doppelt so große zugängliche Oberfläche). Der Film läßt sich von der Folie in wenigen Teilstücken abheben. Für die Wägung habe ich größere Teile von mehreren Filmen verwendet. Durch mehrfache Rehydratation und scharfe Trocknung habe ich Säure- und Basereste entfernt.

8.3. Geschwindigkeiten der Sorption von H_2O

PLH-Filme

Eine Adsorptionskurve für 92% rel. Luftfeuchtigkeit und eine Trocknungskurve über einer Kühlfalle bei 10^{-3} Torr sind in Abb. 26 dargestellt.

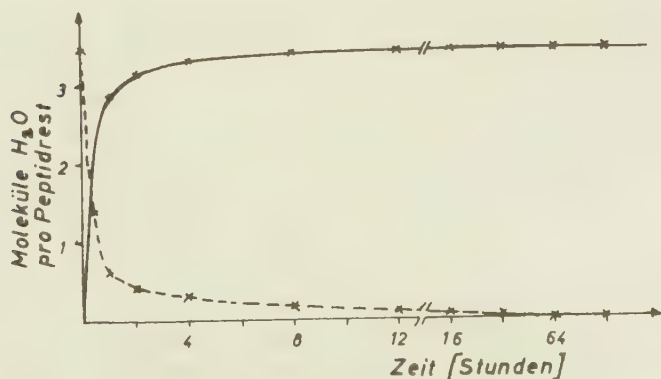


Abb. 26: Sorption von H_2O an PLH-Filmen
— Adsorption bei 90% rel. Luftfeuchtigkeit
--- Desorption über einer Kühlfalle bei 10^{-3} Torr

Aus den Kurven geht hervor, daß die Einstellung großer Feuchtigkeiten beim PLH nach 8 - 16 Stunden bereits zum Gleichgewicht führt, während zur vollständigen Trocknung unter den genannten Bedingungen 2 - 3 Tage erforderlich sind. Man sieht deutlich, daß das letzte halbe Wassermolekül pro Peptidrest relativ schwer zu entfernen ist (s.u.). Bei 90 % rel. Luftfeuchtigkeit sind 3,4 Moleküle H_2O pro Rest adsorbiert.

Na-PLG-Filme

Für den Na-PLG-Film sind in Abb. 27 eine Adsorptionskurve bei 90 % rel. Luftfeuchtigkeit dargestellt und eine Trocknungskurve, ausgehend von 1,7 % rel. Luftfeuchtigkeit (Schwefelsäure-Wasser-Mischung nach (27)).

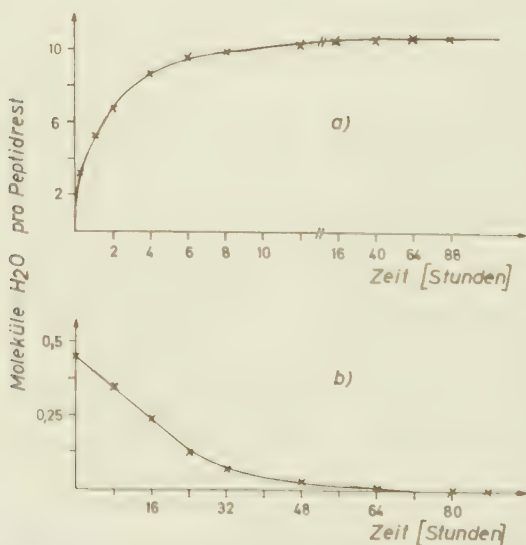


Abb. 27: a) Adsorptionskurve eines Na-PLG-Filmes bei 90 % rel. Luftfeuchtigkeit
b) Trocknungskurve eines Na-PLG-Filmes über einer Kühlfalle bei $<10^{-3}$ Torr von 1,7 % rel. Luftfeuchtigkeit aus

Der zeitliche Verlauf der Desorptionskurve bei Einstellung der anderen Feuchtigkeiten ist in Abb. 28 dargestellt.

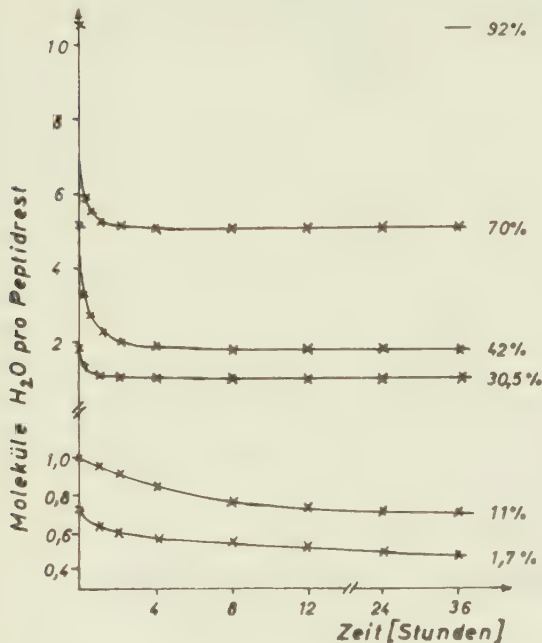


Abb. 28:

Geschwindigkeit der Feuchtigkeits-einstellung in den Filmen in Desorption

Bei diesen Messungen habe ich wie bei den Filmen in den IR-Küvetten nach Anschluß des Salzlösungsgefäßes kurz mit einer Wasserstrahlpumpe evakuiert, bei Feuchtigkeiten unter 30 % mit einer Ölpumpe. Dadurch wird die Desorption natürlich beschleunigt.

Die Kurven bei 11 % und 1,7 % rel. Luftfeuchtigkeit zeigen, daß man in diesem Bereich länger als 36 Stunden zur Einstellung eines Gleichgewichts warten muß; dagegen reichen bei den größeren Feuchtigkeiten 12 - 24 Stunden aus.

Die IR-Spektren zeigen, daß sich die Gleichgewichte noch um einiges schneller einstellen; das ist durch die gleichmäßigeren Schichtdicke dieser Filme zu erklären. Messungen an Poly-L-Lysin Pulver (76) zeigen demgegenüber eine wesentlich langsamere Sorption des Wassers. Offenbar sind die Verhältnisse in Pulverform erheblich anders als in den dünnen Filmen.

8.4. Sorptionsisotherme beim Na-Salz von PLH

Aus den Messungen von 8.3. läßt sich eine Kurve aufzeichnen, die bis auf den Wert bei 90 % rel. Luftfeuchtigkeit eine Desorptionskurve ist (Abb. 29).

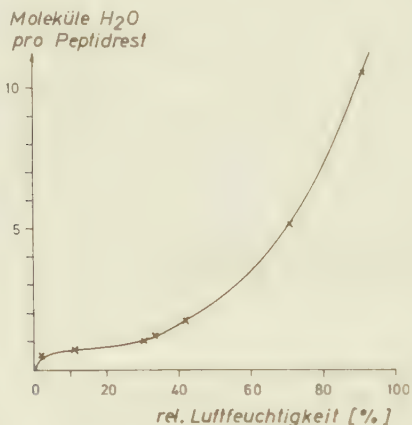


Abb. 29: Sorptionsisotherme für H₂O an Na-PLH-Filmen

Bei 90 % rel. Feuchtigkeit sind 10,5 Wassermoleküle pro Rest adsorbiert. Aus der Kurve geht auch wieder hervor, daß 1/2 Wassermolekül pro Peptidgruppe besonders fest gebunden ist.

Der Nullpunkt der Adsorptionsisotherme wurde nach 2-tägiger Gewichtskonstanz bei scharfer Trocknung nach 8.3. festgelegt. Messungen an PLH-Pulver und trocknen Filmen zeigen, daß unter Umständen auch bei scharfer Trocknung noch Wasser anwesend sein kann (77). Dabei handelt es sich um ein zwischen zwei Säure- bzw. Basenresten gebundenes Wasser (molekular). Die Anwesenheit derartig fest gebundenen Wassers kann jedoch nach den Spektren der zunächst langsam, dann 4 Tage scharf getrockneten Filme ausgeschlossen werden. Insbesondere verschwindet beim Trocknen des deuterierten Films die Scherenschwingung der D₂O-Moleküle um 1.50 cm⁻¹ vollständig. Dagegen kann nach sehr schneller, scharfer Trocknung von über 90 % Luftfeuchtigkeit aus auch nach 4 Tagen die Anwesenheit von Wasser (etwa 1/2 H₂O pro Peptidrest), das sehr kraftig gebunden ist, nicht ausgeschlossen werden. Wegen der starken Verbreiterung der Amidbanden ist eine genauere Bestimmung in diesen Fällen nicht möglich.

3.5. Adsorption flüchtiger Säuren und Basen

Mit der in 8.1. beschriebenen Waage habe ich auch das Adsorptionsverhalten der PLH- und PLG-Filme für die flüchtigen Säuren bzw. Basen untersucht.

PLG-Filme

Ein scharf getrockneter PLG-Film adsorbiert trockenen Pyridindampf offenbar nur an der Oberfläche. Bei nahezu Sättigungsdampfdruck (Pyridin 24,5°C, PLG-Film 25°C) sind nach 12 Stunden erst weniger als 1 Mol % Pyridin adsorbiert. Demgegenüber findet man bei der Adsorption von n-Propylamin unter gleichen Bedingungen den Adsorptionsverlauf von Abb.30. Nach 10 Stunden brach ich den Versuch ab, denn für eine Gleichgewichtseinstellung in den Küvetten ist die Sorptionsgeschwindigkeit wegen der Aggressivität der Dämpfe viel zu klein.

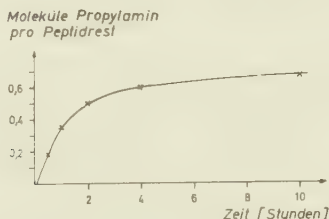


Abb. 30

Adsorption von
n-Propylamin an
einem PLG-Film

PLH-Filme

Von einem scharf getrockneten PLH-Film wird Essigsäure sehr schlecht adsorbiert. Nach 12 Stunden sind bei ziemlich hohem Dampfdruck (Essigsäure 23°C, PLH-Film 25°C, ~95 % Sättigungsdampfdruck) nur 1 Mol % Essigsäure adsorbiert. Bei weiterer Annäherung an den Sättigungsdruck nimmt die Adsorption stark zu. Bei gesättigtem Dampf habe ich eine stetige Adsorption in etwa 1/2 Stunde zur 1:1-Beladung beobachtet.

Mit Ameisensäure erhielt ich bei recht hohem Dampfdruck (Ameisensäure 23°C, PLH-Film 25°C) die Adsorptionskurve von Abb. 31. Die Beladung erreicht dabei 1,7 Moleküle pro Histidinrest. Bei der Aufnahme der Desorptionskurve (10^{-3} Torr und Kühlfalle mit flüssiger Luft) zeigt sich, daß etwa die

Hälfte der Moleküle sehr fest gebunden sind verglichen mit den anderen. Wie man aus den Spektren sieht, sind letztere nach dem Protontransfer an den Histidinrest gebunden, die darüberhinaus adsorbierten stehen vermutlich mit den Peptidgruppen in Wechselwirkung.

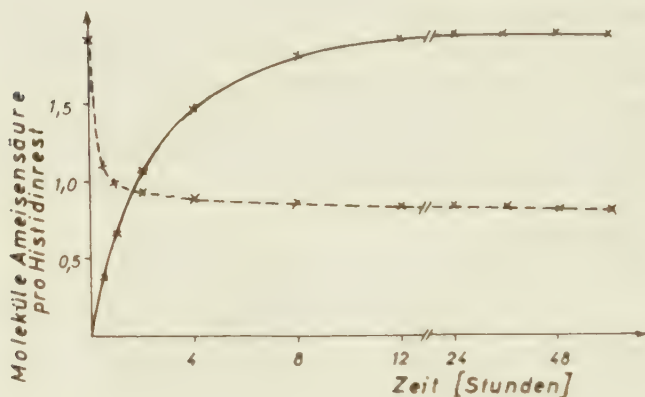


Abb. 31: Sorption von Aminosäure an PLH-Filmen
— Adsorption bei fast gesättigtem Dampfdruck
--- Desorption bei 10^{-3} Torr

Adsorption an feuchten Filmen und Adsorption gleichzeitig mit Wasserdampf

Bei Verwendung von Mischungen mit hohem Wasseranteil (über 80 Mol %) zeigen alle Filme wesentlich mehr und schnellere Adsorption bezüglich Säure bzw. Base. Für die Aufnahme der Spektren habe ich Filme verwendet, die von der Herstellung her noch einen möglichst hohen Anteil der flüchtigen Säure bzw. Base enthielten. Diese habe ich zunächst hydratisiert und dann mit den Säuren oder Basen nachbedampft. Solche Filme zeigen eine besonders schnelle Adsorption. Diese Adsorptionskurven sind jedoch wegen der unterschiedlichen Verhältnisse in den Filmen nicht reproduzierbar.

9. PLG und das Na-Salz

PLG und das Na-Salz sind in Form lösungsmittelfreier Filme insbesondere von Lenormant et al. (20) ausführlich IR-spektroskopisch untersucht worden. Die Autoren haben vor allem die Konformation * betrachtet und dafür auch den IR-Dichroismus der Amidbanden in ausgerichteten Filmen gemessen. Die Filme sind aus Dioxan - Wasser-Mischungen eingetrocknet. In Lösung gibt es mehrere Untersuchungen mittels der IR- und ORD-Spektroskopie (20 - 23). Weitere Arbeiten auch mit anderen Methoden sind in (105) angegeben. Die Autoren fanden, daß PLG in festem Zustand, in vielen Lösungsmitteln und in Lösungsmittel - Wasser-Gemischen in α -helikaler Form vorliegt. Auch in unserem Labor ist von Sessler (24) bei Filmen IR-spektroskopisch α -helikale Struktur gefunden worden. Diese Filme waren aus einer Lösung in Dimethylformamid eingetrocknet worden.

Für das Na-Salz in wäßriger Lösung wurde nach ORD- und CD-Messungen (vgl. (105)) Knäuel-Struktur postuliert. Dagegen wird nach neueren CD-Messungen in (25) und nach theoretischen Überlegungen (26) eine Struktur mit großen Anteilen einer gestreckten Helix mit 2,5 - 3 Peptidresten pro Windung als wahrscheinlichste diskutiert. Lenormant et al. fanden in Filmen bei Luftfeuchtigkeiten über 90 % IR-Banden und Dichroismus, die α -Helix anzeigen. Bei rel. Luftfeuchtigkeit unter 70 % wurde von diesen Autoren antiparallele β -Struktur beobachtet. Die gleiche Struktur fand Sessler beim K-Salz der PLG bei rel. Luftfeuchtigkeiten von 42 % und darunter.

* Mit Konformation oder Sekundärstruktur wird die Anordnung des Polypeptidrückgrats zu spiralförmigen (Helix), blattartigen (β -Struktur) oder geknäuelten Strukturen bezeichnet. Die häufigsten Strukturen der Polyamino-säuren entsprechen denen der Proteine.

Zur Kontrolle der Proben und zum besseren Vergleich mit den Mischungen mit den organischen Basen habe ich auch IR-Spektren von reiner PLG aufgenommen und das Na-Salz in H- und D-Form in Abhängigkeit von der Luftfeuchtigkeit spektroskopisch untersucht. Die Spektren dieser Filme sind in Abb. 32 dargestellt. In Abb. 32b ist daneben ein IR-Spektrum einer Lösung von Na-PLG in 30 H₂O pro Rest gezeigt.

9.1. Amidbanden und Sekundärstruktur

Die Lage der wichtigsten Amidbanden und die Sekundärstruktur habe ich in Tab. 20 zusammengefaßt (S. 81).

Die Amid A und Amid I - V genannten Banden haben nach (78) im wesentlichen den Charakter folgender Schwingungen: γNH , $\nu\text{C=O}$, δNH und νCN , νCN und δNH , δCON , γNH . Der Zusammenhang der Amidbanden I und II bei Polypeptiden mit der Sekundärstruktur ist ausgehend von den Arbeiten (79 - 81) von Miyazawa und Blout (82, 83) aufgeklärt worden. Bei geordneten Proben zeigen diese Banden Dichroismus. In der Literatur ist dieser Zusammenhang - zusammen mit weiterführenden Arbeiten - ausführlich dargestellt, z.B. (84 - 86). Die häufigsten Sekundärstrukturen, α -Helix und antiparallele β -Struktur, verursachen folgende Amid I- und II-Banden (83):

	Amid I	Amid II
Knäuel	1656 s	1535 s
α -Helix	1650 s	1516 w
(rechtshändig)	1652 m	1546 s
antiparallele	1685 w	1530 s
β -Struktur	1632 s	

9.1.1. Amid I- und II-Banden

PLG (Abb. 32a)

Nach der Lage der Amid I- und Amid II-Banden bei 1652 und 1545 cm⁻¹ kann ich in Übereinstimmung mit den oben aufgeführten Untersuchungen (80, 84) auf α -helikale Struktur schließen.

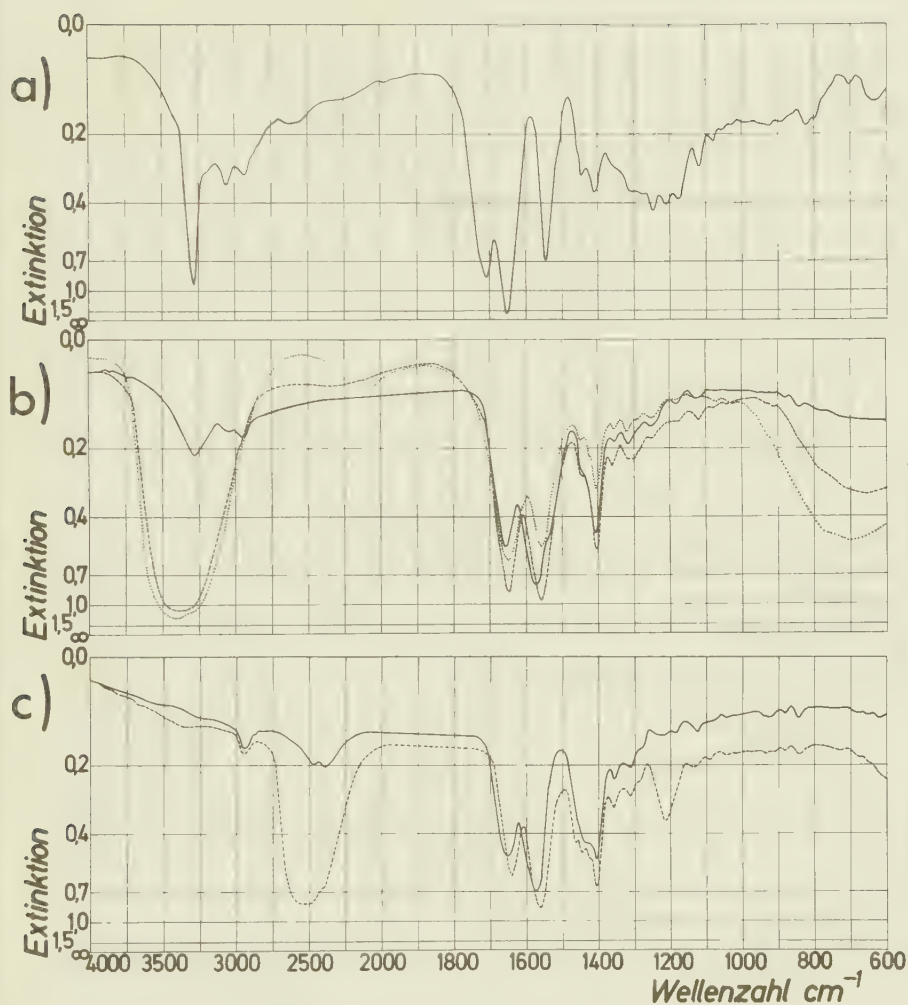


Abb. 32: IR-Spektren von PLG- und Na-PLG-Filmen.

- a) PLG, trocken; b)-g) Na-Salz:
- b) --- 90 % rel. Luftfeuchtigkeit, — schnell scharf getrocknet, --- in 30 H₂O; c) wie b), D-Form;
- d) --- 42 % rel. Luftfeuchtigkeit, — scharf getrocknet;
- e) wie d), D-Form;
- f) --- 30,5 % rel. Luftfeuchtigkeit, — scharf getrocknet;
- g) wie f), D-Form

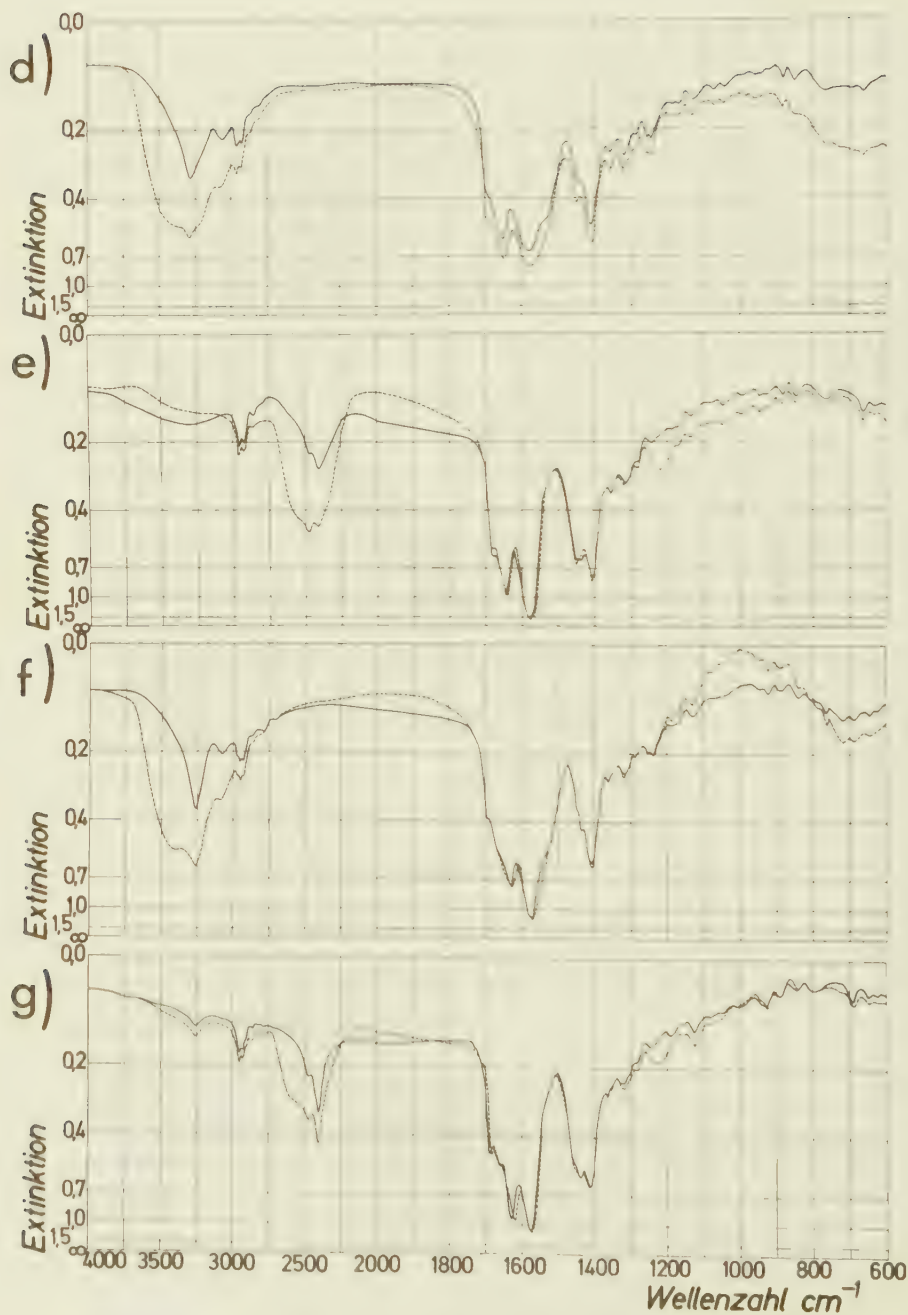


Abb. 32: IR-Spektren von Na-PLG. Erläuterungen s. S.79

rel. Luft- feuchtigkeit	Amid A	Amid B	Amid I	Amid II	Amid V	Sekundär- struktur
<u>PLG, trocken</u>	3280 s	3060 m	1652 vs	1545 s	630 w-m	α -Helix
<u>Na-Salz</u>						
90 % H ₂ O	3280 sh, s	3060 sh, m	1650 vs	1547 sh, s	n.i.	α -Helix
trocken*	3280 s, vbr	3055 w	1654 vs	1540 sh, s	690 w, br	Knäuel
42 % H ₂ O	3290 s	3065 sh	1690 sh 1646 vs	1535 sh, s	670 w	Knäuel mit Anteil β -Strukt.
trocken	3280 s, br	3065 m	1692 sh 1647 vs	1532 sh, s	670 w	Knäuel mit Anteil β -Strukt.
30,5 % H ₂ O	3260 s	3075 sh	1690 sh 1626 vs	1530 sh, s	720 w	β -Struktur
trocken	3260 s	3070 m	1692 sh 1630 vs	1530 sh, s	720 w	β -Struktur
<u>Na-Salz</u>						
90 % D ₂ O	2400 sh, s	-	1642 vs	1450 s	-	α -Helix
trocken	2400 sh, vbr	-	1653 vs	1445 s	-	Knäuel
42 % D ₂ O	2410 s	-	1679 sh 1641 vs	1450 s	-	Knäuel mit Anteil β -Strukt.
trocken	2400 s, br	-	1679 sh 1644 vs	1447 vs	-	Knäuel mit Anteil β -Strukt.
30,5 % D ₂ O	2400 s	-	1682 m 1617 vs	1445 s	-	β -Struktur
trocken	2400 s	-	1686 m 1625 vs	1443 s	-	β -Struktur

Tab. 20: Amidbanden und Sekundärstruktur bei PLG und dem Na-Salz

* trocken bedeutet: von der darüberstehenden Luftfeuchtigkeit aus schnell scharf getrocknet

Na-Salz

Ebenso wie Lenormant et al. finde ich in Abhängigkeit von der Luftfeuchtigkeit eine reversible Strukturumwandlung des Na-PLG-Films.

α -helikale Struktur (Abb. 32b) : Bei den Spektren von Proben bei und über 90 % rel. Luftfeuchtigkeit tritt die Amid I-Bande bei 1654 cm^{-1} und die Amid II bei 1550 cm^{-1} auf. * Das stimmt gut mit den Messungen von Lenormant et al. überein; diese Autoren hatten α -helikale Struktur nachgewiesen. In den Spektren, die nach schneller scharfer Trocknung von 90 % rel. Luftfeuchtigkeit ausgehend aufgenommen sind, ist die Amid I-Bande stark verbreitert. Das deutet auf die Zerstörung der im feuchten Zustand vorhandenen Struktur hin. Der scharf getrocknete Film ist danach nicht mehr in der Lage, sich in die im trockenen Zustand stabile β -Struktur (s.u.) umzuordnen. Daher ergibt sich ein knäuelartiger Zwischenzustand mit einer großen Variation der Abstände und Winkel in den Wasserstoffbrücken zwischen den Restgruppen.

β -Struktur (Abb. 32f): Wenn ich den Hydratationsgrad in Desorption bei 30,5 % rel. Luftfeuchtigkeit einstelle, erhalte ich eine intensive Amid I-Bande bei 1640 cm^{-1} und eine deutliche Schulter bei 1690 cm^{-1} . Dies zeigt einen beträchtlichen Anteil antiparalleler β -Struktur an. Daneben finde ich eine Schulter bei 1655 cm^{-1} , die darauf hinweist, daß außerdem auch noch Anteile an α -helikaler oder Knäuelform vorliegen. Bei scharfer Trocknung verschiebt sich die Amid I-Bande etwas zu höheren Wellenzahlen.

Knäuel mit Anteilen von β -Struktur (Abb. 32d): Wenn ich den Hydratationsgrad bei 40 - 50 % Luftfeuchtigkeit in Desorption einstelle, zeigen meine Proben eine Amidbandenstruktur, die auf Knäuelstruktur mit einem Anteil anti-

* Die genaue Auswertung der Amid II-Bande ist in der H-Form des Na-Salzes durch die Anwesenheit der $\nu_{\text{as}} \text{CO}_2$ -Bande im selben Bereich beeinträchtigt.

paralleler β -Struktur hinweist. Das Maximum der Amid I-Bande liegt um 1647 cm^{-1} , was zeigt, daß große Teile der PLG entweder in α -helikaler oder Knäuelform vorliegen. Die Amid A-Bande bei 3290 cm^{-1} ist stark verbreitert; im Fall α -helikaler Struktur wäre eine scharfe Bande zu erwarten. Hiernach liegt im wesentlichen ein Knäuelzustand vor. Man findet aber darüberhinaus an der Amid I-Bande eine deutliche Schulter bei 1690 cm^{-1} . Hieraus ist nur unter Vorbehalt zu schließen, daß es auch einen Anteil antiparalleler β -Struktur gibt; die entsprechende Hauptbande müßte bei $1630\text{--}35\text{ cm}^{-1}$ verdeckt sein. Dafür spricht noch die Schulter zu kleineren Wellenzahlen an der Amid A-Bande. Das Auftreten einer anderen geordneten Struktur kann aber nicht ausgeschlossen werden.

Na-Salz, D-Form (Abb. 32c, e, g)

Die Bandenverschiebungen beim Deuterieren entsprechen etwa den Werten bei Lenormant et al. und Sessler. Die Amid I-Bande zeigt in der β -Struktur die entsprechende Aufspaltung. Die Amid II-Bande wird in der D-Form von CH-Banden überlagert.

9.1.2. Amid A- und B-Banden

In der PLG liegt die Amid A-Bande bei 3280 cm^{-1} , die Amid B um 3060 cm^{-1} . Beim Na-Salz finde ich die Amid A-Bande in der β -Struktur bei 3260 cm^{-1} und in den anderen Fällen bei 3280 cm^{-1} . Die besonders niedrige Lage in der β -Struktur zeigt die Stärke der in dieser Struktur linear ausgebildeten Wasserstoffbrücken an. Bei den hydratisierten Filmen liegen die Banden höher, das zeigt eine Tendenz zur Schwächung der Wasserstoffbrücken. Die Amid B-Bande liegt um 3070 cm^{-1} ; in der β -Struktur liegt sie besonders hoch, demnach ist hier die Kopplung mit der Amid A gering. In dem von 90 % Luftfeuchtigkeit aus schnell getrockneten Film ist die Amid A-Bande stark verbreitert, hier liegt offenbar ein relativ ungeordneter Zustand vor (s.o.). In der D-Form des Na-Salzes zeigt die Amid A-Bande die erwarteten Verschiebungen.

9.1.3. Die Amid III-, IV- und V- Banden

Die Amid III-Bande ist in der PLG durch die Banden der Glutaminsäurereste verdeckt. Beim Na-Salz erscheinen im Bereich der Amid III-Bande zwei Spitzen bei 1245 cm^{-1} und 1258 cm^{-1} , je nach Struktur des Rückgrats unterschiedlich ausgeprägt. Der Vergleich mit den deuterierten Proben zeigt, daß nicht diese Maxima, sondern eine breite, relativ schwache Absorption bei 1250 cm^{-1} verschwindet, die der Amid III-Bande zugeordnet werden kann.

Die Amid IV-Bande ist wenig charakteristisch und in ihrer Lage in Polypeptiden nicht bestimmten Sekundärstrukturen zugeordnet. Ich habe sie daher nicht diskutiert.

Die Amid V-Bande soll nach (87) von der Struktur abhängig sein und bei folgenden Wellenzahlen liegen: α -Helix um 615 cm^{-1} , β -Struktur um 700 cm^{-1} und Knäuel um 690 cm^{-1} .

Damit stimmen spätere Untersuchungen von Tsuboi am Polyzylglutamat (88) und von Suzuki am Polyglycin I (89) überein. Demgegenüber fand Mählinghaus (90) beim PLH und PLH-HCl diese Bande trotz der Konformationsumwandlung α -Helix $\rightarrow$ β -Struktur konstant bei 690 cm^{-1} .

Ich erhalte ebenfalls eine deutliche Abhängigkeit der Absorptionsbanden in diesem Bereich in Abhängigkeit von der Konformationsumwandlung. Bei der β -Struktur des Na-Salzes ist die relativ kräftige Bande bei 700 cm^{-1} der Amid V zuzuordnen. Bei der α -helikalen Struktur findet man im Fall des PLG bei 630 cm^{-1} und im Fall des Na-Salzes bei 90 % rel. Luftfeuchtigkeit bei 615 cm^{-1} eine schwachere Bande, die der erwarteten Lage der Amid V entspricht.

9.1.4. Aufspaltung der $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ -Bande bei Ausbildung der β -Struktur

Die Banden der CH_2 -Schwingungen zeigen eine deutliche Abhängigkeit vom Protonentransfer. Sie sind offenbar auch empfindlich bezüglich der Sekundärstruktur. Nur bei der Ausbildung der β -Struktur spaltet die $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ -Bande um 2900 cm^{-1} im Na-Salz ebenso wie im K-Salz (24) in zwei getrennte sehr scharfe Banden auf.

9.2. Banden der Säuregruppe bei PLG

Im frisch aus einer pyridinhaltigen Lösung eingetrockneten Film finde ich die kräftige $\nu\text{C=O}$ -Bande bei 1725 cm^{-1} , bei mehrfacher Rehydratation und Trocknung verschiebt sich diese Bande zu kleineren Wellenzahlen bis 1708 cm^{-1} . Die gleiche Beobachtung machten Lenormant et.al. bei PLG-Filmen aus Dioxan-Wasser-Mischungen. Übereinstimmend mit diesen Autoren nehme ich an, daß im frisch eingetrockneten Film die vom Lösungsmittel aufgebrochene Dimeren-Struktur der Carbonsäuregruppen sich erst allmählich wieder bildet.

Bei der Umordnung der COOH- zur CO_2^- -Struktur verschwinden Absorptionsbanden bei 1370 , 1250 , 1220 und 1185 cm^{-1} . Bei Deuterierung der Säuregruppe verschieben sich nur die Banden bei 1370 und 1185 cm^{-1} . Das läßt darauf schließen, daß diese Banden δOH und νCO Schwingungen zuzuordnen sind, während die anderen beiden Absorptionen der benachbarten CH_2 -Gruppen angehören. Die Banden bei 1250 und 1220 cm^{-1} sind in den Spektren jedoch am besten zu beobachten und erweisen sich sehr geeignet, den Protontransfer zu verfolgen. Nach den Beobachtungen an den monomeren Säuren ist es durchaus möglich, auch CH -Banden als Maß für den Protontransfer heranzuziehen.

In Anlehnung an Sessler ordne ich der γOH -Schwingung die schwache Bande bei 896 cm^{-1} zu.

9.3. Banden der Carboxylatgruppe beim Na-Salz

Die $\nu_{\text{as}}\text{CO}_2^-$ -Bande finde ich bei 1573 cm^{-1} in den scharf getrockneten Filmen und bei 1560 cm^{-1} in den bei 90 % rel. Luftfeuchtigkeit hydratisierten Filmen. Die $\nu_{\text{s}}\text{CO}_2^-$ -Bande beobachte ich bei 1410 cm^{-1} in der β -Struktur im scharf getrockneten Film, mit der Hydratation verschiebt sie sich zu kleineren Wellenzahlen bis 1405 cm^{-1} bei 90 % rel. Luftfeuchtigkeit. Lenormant et al. und Sessler finden diese Banden ebenfalls in den genannten Bereichen.

10. Abhängigkeit des Protontransfers vom ΔpK_a bei Assoziaten von PLG mit den N-Basen

Die Abhängigkeit des Protontransfers vom ΔpK_a soll an Hand der Spektren der scharf getrockneten Proben diskutiert werden (Abb.33). Vom Protontransfer in den Wasserstoffbrücken Carboxylgruppe- N-Base wird die Sekundärstruktur des PLG beeinflusst. Im Folgenden soll zunächst die bei Anwesenheit der einzelnen Basen vorliegende Struktur an Hand der Amid-Banden betrachtet werden. Es wird sich zeigen, daß nur im Fall des Propylaminassoziates - ähnlich wie beim Na-Salz - eine β -Struktur auftritt.

10.1. Amid-Banden und Sekundärstruktur

Die Amidbanden in den PLG - N-Base - Assoziaten sind in Tab. 21 zusammengestellt.

10.1.1. Amid I- und II-Banden

β -Struktur

Bei den langsam getrockneten Filmen des PLG - n-Propylamin-Assoziats zeigen Lage und Aufspaltung der Amid I- und II-Banden deutlich das Auftreten einer antiparallelen β -Struktur. Die Amid I zeigt die Hauptbande bei 1622 cm^{-1} , außerdem tritt sehr scharf ausgeprägt die zu dieser Struktur gehörende schwächere Bande bei 1642 cm^{-1} auf. Eine schwache Schulter bei 1650 cm^{-1} zeigt, daß ein sehr kleiner Teil in ungeordneter Struktur oder in α -Struktur vorliegt. Die Amid II-Bande liegt bei 1530 cm^{-1} , wie für die β -Struktur erwartet wird.

Allerdings sind die Verhältnisse in den PLG - n-Propylaminfilmen dadurch kompliziert, daß Propylamin beim Eintrocknen aus dem Film entweicht, obwohl weitestgehender Protontransfer eingetreten ist (s.u.) . Dies geschieht auch bei der einige Tage dauernden Umwandlung in die β -Struktur, wie man in Abb.33 a an einer schwachen $\nu\text{C}=\text{C}$ Bande sieht. In der Abb. sind noch zwei weitere PLG-Propylamin-Spektren dargestellt: In den einen Film habe ich durch Nachbedampfen

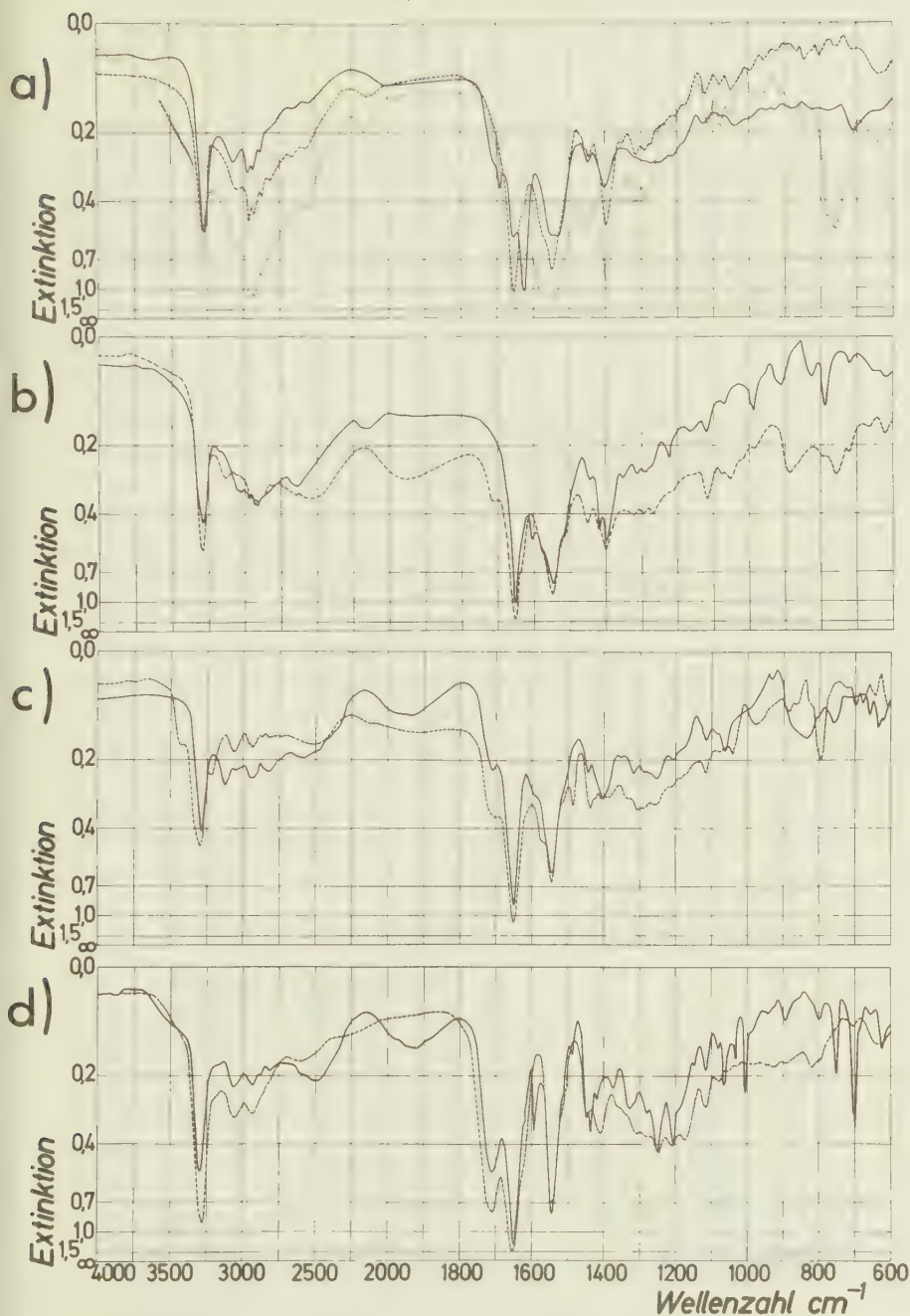


Abb. 33: IR-Spektren von Assoziaten der PLG mit:
a) n-Propylamin (—B-Struktur, --- α -Helix, Basenüberschuß);
b) Picolylamin, ---2-Äthylimidazol;
c) Imidazol, ---3-Aminopyridin; d) Pyridin, ---PLG, z.Vgl.

	Amid A	Amid B	Amid I	Amid II	Amid V
PLG - D-Protylamid α-Helix	3288 s	verdeckt	1655 vs	1549 s	640 w
PLG - D-Protylamid β-Struktur	3280 s	verdeckt	1690 w-m 1622 vs	1530 s	705 w-n
PLG - Picolylamin	3290 s	verdeckt	1654 vs	1549 s	655 w
PLG - 2-Äthylimidazol	3290 s	3060 w	1653 vs	1549 s	655 *
PLG - Imidazol	3295 s	3060 w	1654 vs	1548 s	verdeckt
PLG - 3-Aminopyridin	3295 s	3060 m	1655 vs	1551 s	655 w
PLG - Pyridin	3292 s	3060 m	1653 vs	1548 s	655 w

PLG - Imidazol, D-Form	2460 s	-	1650 vs	1442 s	-

* mit Basenbanden überlagert

Tab. 21: Amidbanden bei PLG - N-Base-Assoziaten

wieder 100% Propylamin (1 Molekül pro Peptidrest) gebracht. Die α -Struktur ist dadurch jedoch zerstört. Der Lage und Schärfe der Amidbanden nach liegt in diesem Film ebenso wie in dem mit Propylaminüberschuß bedampften Film eine α -helikale Struktur vor. Bei Desorption des Propylamins tritt bei Anwesenheit von etwa 100 % die Ausbildung der β -Struktur wieder ein. Man erhält also in den Filmen eine reversible Strukturumwandlung in Abhängigkeit vom Propylaminüberschuß.

α -Helix oder Knäuel

In den anderen Systemen liegt die Amid I-Bande zwischen 1650 und 1655 cm^{-1} und die Amid II-Bande bei 1550 cm^{-1} . Nach der Lage dieser Banden, insbesondere der Amid II, handelt es sich bei der Struktur des PLG-Rückgrats in diesen Mischungen um eine α -Helix. Die relativ hohe Geschwindigkeit des H-D-Austausches in den NH-Gruppen des Polypeptidrückgrats im System PLG - Imidazol (der Austausch ist bei 25°C und 90 % rel. Luftfeuchtigkeit in 20 Stunden fast vollständig) zeigt, daß die α -Helix sehr instabil ist (91). Dafür spricht auch die relativ große Halbwertsbreite der Amid I-Bande von 25 cm^{-1} (92).

In der D-Form liegt im System PLG - Imidazol die Amid I-Bande ebenfalls bei 1650 cm^{-1} und die Amid II bei 1442 cm^{-1} ; diese Bande zeigt damit die erwartete Verschiebung.

10.1.2. Amid A- und Amid B-Banden

Die Amid A-Bande ist in allen Assoziaten kräftig und ziemlich scharf ausgeprägt. Sie liegt in der β -Struktur bei PLG - n-Propylamin bei 3280 cm^{-1} , in der α -Struktur dieses Assoziats bei 3288 cm^{-1} . Die Wasserstoffbrücken zwischen den Peptidgruppen sind also auch beim n-Propylaminsalz in der β -Struktur besonders kräftig, wenn auch nicht so ausgeprägt wie beim Na-Salz. Die Amid B-Bande ist bei den meisten Assoziaten als schwache bis mittelstarke Bande zu sehen, in den Mischungen mit n-Propylamin und Picolylamin ist dieser Bereich von den NH-Banden überlagert.

10.1.3. Amid III- und Amid V-Banden

Die Amid III-Bande kann nach einem Vergleich mit den Spektren der deuterierten Probe im System PLG - Imidazol genau wie beim Na-Salz einer sehr breiten relativ schwachen Absorption um 1250 cm^{-1} zugeordnet werden.

In der β -Struktur von PLG - n-Propylamin tritt die Amid V-Bande bei 105 cm^{-1} mit mittlerer Intensität auf, in der α -Helix findet man eine entsprechende, aber schwächere Bande zwischen 65 und 140 cm^{-1} , die im System PLG - Imidazol bei Deuterierung der NH-Gruppen des Rückgrats aus dem untersuchten Spektralbereich verschwindet. Nach (64) bestätigt das die Anwesenheit der β -Struktur bei PLG - n-Propylamin und spricht für α -Helix oder Knäuel in den anderen Assoziaten.

10.1.4. Aufspaltung der $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ -Bande bei Ausbildung der β -Struktur

Bei PLG - n-Propylamin ist der Bereich der $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ -Bande der Seitengruppe von den CH_2 -Banden des n-Propylamins überlagert. In den anderen Assoziaten mit Knäuel- oder helikaler Struktur findet man keine deutliche Aufspaltung dieser Bande.

10.2. Diskussion des Protontransfers an Hand der Carboxylbanden

Wie bei den Modellsystemen geben die Carboxylbanden im Bereich $2000 - 1000\text{ cm}^{-1}$ die beste Information über die Wasserstoffbrücken und den Protontransfer. In Tab. 22 sind diese Banden für die scharf getrockneten Filme zusammengestellt.

Das Verhalten der COOH - und CO_2^- -Banden bei diesen Assoziaten ist sehr ähnlich wie bei der Messreihe mit den monomeren Modellsystemen. Insbesondere zeigt sich wieder keine kontinuierliche Verschiebung der Carboxylatbanden

mit der Zunahme des ΔpK_a . Statt dessen treten die Carboxylbanden wie in den Dimeren bei PLG auf oder die Carboxylatbanden wie im Na-Salz. Bei denjenigen Systemen, bei denen teilweiser Protontransfer eingetreten ist, beobachtet man sowohl die Banden der Säure- wie auch die der Salzform. Das ist in Abb. 34 an einem Beispiel (PLG - Imidazol) gut zu sehen.

	$\nu_{C=O}$	Glu-Rest Säure-Form	$\nu_{as} CO_2^-$ *	$\nu_s CO_2^-$
n-Propylamin, α -Helix	-	-	1565 s	1400 s
n-Propylamin, β -Struktur	-	-	1555-60 s	1400 s
Picolylamin	1710 w, sh	-	1560 s	1399 s
2-Äthylimidazol	1712 m	1252 vw	1560 m-s	1400 m
Imidazol	1712 m-s	1253 w-m	1555 m-s	1400 w-m
Imidazol, D-Form	1710 m-s	n.i.	1553 m-s	1400 m
3-Aminopyridin	1710 m-s	1253 w-m	1563 m	verdeckt
Pyridin	1712 s	1252 m	-	-
Na-Salz, α -Helix	-	-	1573 s	1408 s
Na-Salz, β -Struktur	-	-	1573 s	1410 s
PLG	1708 s	1250 m	-	-

* von Amid II überlagert

Tab. 22: $COOH$ - und CO_2^- -Banden von PLG in den Assoziaten mit den N-Basen

Nach der Lage dieser Banden tritt auch in den PLG - N-Base Wasserstoffbrücken kein symmetrisches Einfachminimum-potential auf.

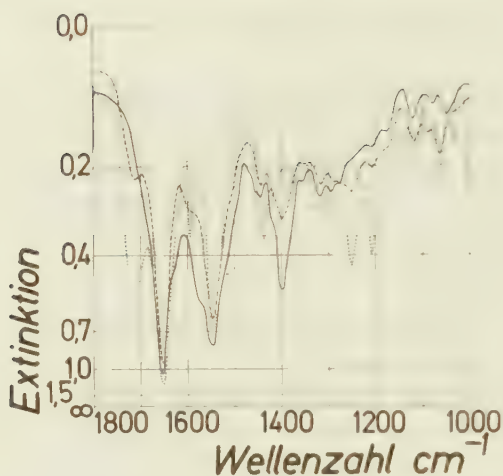


Abb. 34:

IR-Spektren von:
 — PLG - n-Propylamin
 --- PLG - Imidazol
 PLG - Pyridin

10.2.1. PLG - n-Propylamin (Abb. 33a)

In allen Filmen mit äquimolarer oder größerer Menge n-Propylamin verschwinden die Banden der Säureform, und es treten die kräftigen Banden der CO_2^- -Gruppe auf. Das bedeutet, daß vollständiger Protontransfer eingetreten ist. *

In den Filmen mit β -Struktur sind Reste der $\nu\text{C=O}$ -Banden zu beobachten, weil n-Propylamin aus dem Film entwichen ist. Wie oben erwähnt, habe ich diesen Basenanteil nicht wieder in den Film gebracht, um die β -Struktur nicht zu zerstören.

Die CO_2^- -Banden liegen bei kleineren Wellenzahlen (bei 1560 und 1400 cm^{-1}) als beim Na-Salz. Die Verschiebung beträgt etwa 10 Wellenzahlen; das entspricht den Verhältnissen in den Modellsubstanzen und ist auf den Einfluß der $\text{NH}^+\cdots\text{O}^-$ -Wasserstoffbrücken zurückzuführen. Diese Brücken werden wie bei den Monomeren durch die breite Absorption im Bereich um 2700 cm^{-1} angezeigt.

* Ein vollständiger Protontransfer wird auch bei Copolymeren von L-Glutaminsäure und L-Lysin gefunden, wenn die Zahl der basischen Gruppen überwiegt (93). Dabei liegt ein ähnlicher ΔpK_a vor.

Darüberhinaus ist die Lage dieser Banden von der Sekundärstruktur abhängig. In der β -Struktur liegt die $\nu_{as} \text{CO}_2^-$ -Bande bei $1555 - 60 \text{ cm}^{-1}$ gegenüber 1565 cm^{-1} in der α -helikalen Form. Eine Abhängigkeit dieser Banden von der Konformation finden auch König et al. (94) in Raman-Spektren. Die Abhängigkeit ist verständlich, da die sterischen Umordnungen sicherlich die Stärke der oben erwähnten Wasserstoffbrücken beeinflussen. Daneben kann auch eine Kopplung wie im Fall der Amidbanden zu einer derartigen Verschiebung führen.

10.2.2. PLG - Picolylamin (Abb. 33b)

Hier zeigen die Banden ebenfalls stets nahezu vollständige Ablösung des Protons von der Carboxylgruppe an. Bei 10 - 20 % Überschuß an Base verschwindet die $\nu \text{C=O}$ -Schulter immer vollständig. Die CO_2^- -Banden liegen bei 1565 und 1402 cm^{-1} wie bei der helikalen Form im System PLG - n-Propylamin.

10.2.3. PLG - 2-Äthylimidazol , PLG - Imidazol und PLG - 3-Aminopyridin (Abb. 33 b u. c)

In diesen Mischungen treten sowohl die Banden der COOH -Gruppe wie auch die der CO_2^- -Gruppe auf. Hiermit beobachtet man in allen diesen Systemen teilweisen Protontransfer.

Die Intensität der Banden der Säureform nimmt in dieser Reihe mit fallendem ΔpK_a etwas zu. Die $\nu \text{C=O}$ -Bande liegt um 1710 cm^{-1} wie in den Dimeren. Die anderen zur Säureform gehörenden Banden bei 1250 , 1220 und 1185 cm^{-1} sind nur schwach vertreten, die δOH um 1400 cm^{-1} ist von der kräftigen $\nu_s \text{CO}_2^-$ -Bande verdeckt.

Die CO_2^- -Banden liegen bei $1560 - 65 \text{ cm}^{-1}$ und bei 1410 cm^{-1} . Die erstere ist durch die Amid II-Bande überlagert. In der Mischung mit 3-Aminopyridin sind beide CO_2^- -Banden zusätzlich noch von Schwingungen der protonierten Base überlagert. Die Banden sind in scharf getrockneten Filmen sehr breit und verschwinden leicht im Untergrund durch die Überlagerung mit den Banden des PLG-Rückgrats, den übrigen Banden der Seitenketten und den Banden der Basen.

10.2.4. PLG - Pyridin (Abb. 33 d)

Die Filme habe ich, wie in 7.5.1.3. beschrieben, hergestellt. Nach der UV-Messung sind in diesem Film 1,6 Moleküle Pyridin pro Glutaminsäurerest enthalten. In dem Spektrum sind keine CO_2^- -Banden vorhanden, das ist bei 1400 cm^{-1} gut zu erkennen. Dafür findet man bei 1712 cm^{-1} eine kräftige $\nu\text{C=O}$ -Bande, die in Lage und Intensität der in PLG ähnlich ist.* Hiernach beobachtet man in diesem System trotz N-Basenüberschuß keinen Protontransfer.

Allerdings könnte man die erhaltenen Befunde auch dann verstehen, wenn sich die $\text{OH}\cdots\text{N}$ -Brücken gar nicht bildeten, d.h. wenn die dimere Struktur der Carbonsäuregruppen erhalten bliebe. Nach weiteren Beobachtungen ist dies jedoch nicht der Fall. Die wichtigsten Beweise für die Bildung der $\text{OH}\cdots\text{N}$ -Brücken liefern einerseits die intensiven Absorptionsbanden im Bereich $3000 - 1300 \text{ cm}^{-1}$, die sich von denen des reinen PLG wesentlich unterscheiden (s. 10.5.), andererseits einige Banden des Pyridins (s. 10.4.).

10.3. Quantitative Bestimmung des Protontransfers

Im Folgenden soll der Umfang des Protontransfers in Abhängigkeit vom pK_a der Basen quantitativ betrachtet werden. Wie bei den monomeren Modells-substanzen habe ich als Maß für den Protontransfer die Intensität der $\nu\text{C=O}$ -Bande angenommen. Als Bezugssystem habe ich analog zu den Modells-substanzen den PLG - Pyridin-Film verwendet. Damit wird die relative Intensität der $\nu\text{C=O}$ -Bande in den anderen Systemen definiert als

$$I_{\text{rel}} = \frac{I(\nu\text{C=O})}{I_{\text{F}}(\nu\text{C=O})} \cdot D$$

Mit dem Index p sind die Intensitäten im System PLG - Pyridin gekennzeichnet. Der Faktor D berücksichtigt die unterschiedliche Anzahl der Glutaminsäurereste pro durchstrahlter

* Eine ähnliche Lage (bei 1710 cm^{-1}) finde ich auch in einer Lösung mit Pyridinüberschuß ($\text{PLG} + 6 \text{ Pyridin} + 2 \text{ H}_2\text{O}$)

Fläche (das betrifft hier im wesentlichen die unterschiedliche Schichtdicke, die bei den Filmen wegen der unterschiedlichen Nachbehandlung und der Verwendung verschiedener Proben-träger erheblich schwankt). Den Korrekturfaktor habe ich in den einzelnen Systemen an Hand der Amidbanden Amid A und Amid I bestimmt. Dabei habe ich die Werte aus beiden Banden gemittelt, damit wird

$$D = \frac{1}{2} \left(\frac{I_p(\text{Amid A})}{I(\text{Amid A})} + \frac{I_p(\text{Amid I})}{I(\text{Amid I})} \right)$$

Die Intensität der Amidbanden ist zum Teil strukturabhängig. Jedoch liegt in allen Systemen, die im Folgenden verglichen werden, weitgehend die gleiche Struktur vor, nämlich die α -Helix. Nicht völlig ausgeschlossen werden kann allerdings das Auftreten von geknäuelten Bereichen. Nach (92) und (92 a) nimmt jedoch die integrale Extinktion bei einem vollständigen Übergang Knäuel $\rightarrow$ α -Helix bei der Amid I-Bande nur um 8 % zu; die Stärke der Wasserstoffbrücken in der Amidgruppe - die ebenfalls die Intensität beeinflussen kann - ändert sich nach der Bandenlage der Amid A sehr wenig.

Die Absorptionsintensitäten sind wie bei den Modellsystemen als integrale Extinktion $I = \int E(\nu) d\nu$ für die betreffenden Banden ausgemessen. Die Intensitätsmessungen sind alle aus mindestens 2 Meßwerten von verschiedenen Filmen gemittelt.

Ergebnisse

Die Ergebnisse habe ich in Tab. 23 zusammengefaßt und in Abb. 35 in Abhängigkeit vom ΔpK_a dargestellt.

	ΔpK_a	Protontransfer %
PLG - n-Propylamin	6,25	100
PLG - Picolylamin	5,2	95
PLG - 2-Äthylimidazol	3,6	74
PLG - Imidazol	2,5	56
PLG - 3-Aminopyridin	1,53	49
PLG - Pyridin	0,8	0

Tab. 23: Protontransfer in PLG - N-Base-Assoziaten

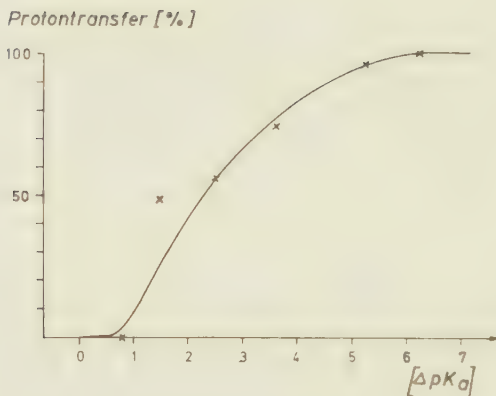


Abb. 35: Protontransfer in PLG - N-Base-Assoziaten in Abhängigkeit vom ΔpK_a

Durch die Meßpunkte läßt sich eine ähnliche Kurve legen wie bei den Modellssubstanzen. 50 % Protontransfer, d.h. eine symmetrische Wasserstoffbrücke, liegt hiernach bei einem ΔpK_a von ungefähr 2,5 vor, das entspricht etwa dem Wert beim Assoziat PLG - Imidazol.

In Abb. 35 fällt auf, daß der Punkt für 3-Aminopyridin etwas abseits der Kurve liegt, mehr als im System Essigsäure + 3-Aminopyridin. Das legt die Vermutung nahe, daß dies auf einer zusätzlichen Wechselwirkung der Aminogruppe mit den Peptidgruppen des Rückgrats beruhen.

Man erhält damit einen ähnlichen ΔpK_a -wert für 50 % Protontransfer wie in den Mischungen der Monomeren. Dort war der ΔpK_a 2,7. Die Abweichung zeigt, daß die pK_a -Werte von PLG und Essigsäure nicht ganz vergleichbar sind. Das ist einmal durch die unterschiedliche Struktur von Essigsäure und den Poly-L-Glutaminsäurebausteinen zu erklären, zum anderen durch Wechselwirkungen im Fall der PLG, wie sie im Unterschied von pK_0 und pK_a (bei Halbprotonierung) zum Ausdruck kommen.

Ein dritter Punkt kommt hinzu: Die Glutaminsäurereste liegen auch bei Titration in verdünnter Lösung weitgehend als Dimere vor, da sie innerhalb einer Kette sich in enger Nachbarschaft befinden. Die Änderung der freien Energie beim Aufbrechen dieser Brücken bei der Neutralisation geht in den pK_0 - und pK_a -Wert ein. Dies ist für den allgemeinen Fall von Wasserstoffbrückenbildenden Seitengruppen in (95) diskutiert.

10.4. Veränderungen an den Banden der Basen

Bisher habe ich den Protontransfer an Hand der Banden der Carboxylgruppen betrachtet. Dieselben Ergebnisse sollte man bei Betrachtung der Banden der N-Basen erhalten können. Hierbei treten jedoch wieder die in 3.4. und 4.3. beschriebenen Effekte auf, welche die quantitative Auswertung komplizieren. Daher habe ich die Veränderungen an den Banden der Basen nur qualitativ verfolgt, indem ich die Banden mit denen der reinen Basen, der mit HCl protonierten Form und der Mischung mit Essigsäure verglichen habe. In Tab. 24 habe ich jeweils eine deutlich erkennbare Bande aufgeführt; auf das System PLG - Imidazol gehe ich im Zusammenhang mit der Abhängigkeit des Protontransfers von der Hydratation noch ausführlicher ein.

	reine Base	Assoziat m.Essigs.	Assoziat mit PLG	protoniert m.HCl in H_2O
n-Propylamin	1080 m	1050 m	1045 w-m	1040 s,br
Picolylamin	1598 w-m		1608 m	1610 m
2-Athylimidazol	-	1635 m	1630 sh	1632 s
Imidazol	-	1594 sh,w	1595 w	1590 s
3-Aminopyridin	-	1345 sh,w	1342 sh,w	1347 s
Pyridin	1583 s	1597 s	1596 s	1634 vs

Tab.24 Banden der Basen in den Assoziaten mit PLG

Lage und Intensität der Banden sind in den Assoziaten mit PLG und mit Essigsäure sehr ähnlich.

10.5. Absorptionen der Gruppen in den Wasserstoffbrücken im Bereich 3500 - 1700 cm⁻¹

Die Absorptionsstruktur im Bereich 3500 - 1700 cm⁻¹, insbesondere die Änderung mit dem Ionentransfer, entspricht weitgehend den Verhältnissen in den Modellsubstanzen. Die in diesem Bereich auftretenden Banden sind durch die Anwesenheit der starken Wasserstoffbrücken verursacht. Ihre Herkunft und Zuordnung ist in Teil A ausführlich diskutiert. Die Banden sind in Tab. 25 zusammengestellt, und in Abb. 36 sind die Spektren von drei Assoziaten als Beispiele dargestellt.

PLG-- n-Propylamin	2850-2400 s,vbr*	2155 w-m***
PLG - Picolylamin	2850-2400 s,vbr*	2140 w-m
PLG - 2-Äthylimidazol	** 2550 m-s,br	1950 m-s,br
PLG - Imidazol	** 2550 m-s,br	1950 m-s,br
PLG - 3-Aminopyridin	** 2500 m,br	1950 w,vbr
PLG-- Pyridin	** 2490 m-s,br	1930 m-s,br

* Bande bei hohen WZ verdeckt

** ev. ist in diesem Bereich eine "A"-Bande verdeckt

*** in der B-Struktur bei weniger als 100% Propylamin nicht ausgeprägt

Tab. 25 Banden der PLG-Base-Assoziante im Bereich 2900-1700 cm⁻¹



Abb. 36:

IR-Spektren:

— PLG - n-Propylamin

--- PLG - Imidazol

.... PLG - Pyridin

Beschreibung der Banden

In den Assoziaten mit n-Propylamin und Picolylamin erstreckt sich eine sehr breite, sehr kräftige Absorption der $\text{NH}^+\cdots\text{O}^-$ -Brücken, bei etwa 2400 cm^{-1} beginnend, zu höheren Wellenzahlen; bei 2800 cm^{-1} wird sie von CH-Banden überlagert. Bei Picolylamin tritt ein deutliches Submaximum bei 2550 cm^{-1} auf, bei n-Propylamin liegen um 2500 cm^{-1} mehrere schwächere Submaxima. Bei niedrigeren Wellenzahlen findet man in beiden Systemen, wie in den Mischungen mit Essigsäure, eine relativ scharf ausgeprägte Bande, bei 2155 cm^{-1} im Fall des Propylamins und bei 2140 cm^{-1} im Fall des Picolylamins.

Bei den übrigen Assoziaten sind zwei sehr breite, kräftige Banden zu beobachten, die von den $\text{NH}^+\cdots\text{O}^-$ und $\text{OH}\cdots\text{N}$ -Brücken herrühren. Bei den Assoziaten PLG - 2-Athylimidazol und PLG - Imidazol liegen diese bei 2550 und 1950 cm^{-1} , im Fall des PLG- Pyridin bei 2480 und 1930 cm^{-1} . Im Assoziat PLG- 3-Aminopyridin ist insbesondere die Bande um 1950 cm^{-1} nur schwach ausgebildet. Interessant ist, daß in diesem Fall der Spektrenuntergrund bei kleineren Wellenzahlen stark angehoben ist. In den Spektren ist ev. eine "A"-Bande verdeckt.

Kontinuierliche Absorption

Es ist zu erwarten, daß in einigen Systemen auch eine kontinuierliche Absorption auftritt. In diesen Filmen tritt aber eine starke wellenzahlabhängige Streuung insbesondere an den Oberflächen auf. Da ich die Nulllinie, wie in 7.7.2. beschrieben, durch Kompensation dieser Streuung begradigt habe, kann ich eine kontinuierliche Absorption nicht mehr quantitativ auswerten.

11. Abhängigkeit des Protontransfers von der Hydratation in den PLG-Base-Assoziaten

Die Abhängigkeit des Protontransfers von der Hydratation habe ich in hydratisierten Filmen und durch Herstellung wäßriger Lösungen bzw. pastenförmiger Gemische untersucht. Während ich bei den letzteren die entsprechende Wassermenge zugegeben habe, habe ich den Wasseranteil in den Filmen über die Intensität der νOH -Banden des Wassers bestimmt. Die Intensität habe ich durch Abziehen der Spektren der hydratisierten Filme von denen der getrockneten gemessen. Zum Vergleich und als absolutes Maß dienten mir die Banden und die Adsorptionswägungen am Na-Salz. Für den Ausgleich unterschiedlicher Schichtdicken habe ich wie bei der Bestimmung des Protontransfers die Amidbanden herangezogen.

Es wird sich zeigen, daß die Sekundärstruktur sich bis auf den Fall PLG - n-Propylamin, bei dem jedoch immer vollständiger Protontransfer vorliegt, nicht wesentlich ändert. Deshalb gehe ich auf diese erst später gegen Schluß des Kapitels ein.

Zunächst bespreche ich das System PLG - Imidazol, bei dem ich die Abhängigkeit von der Hydratation am eingehendsten untersucht habe.

11.1. PLG - Imidazol + n H₂O

Die Spektren der in steigendem Ausmaß hydratisierten Filme und der mit 8, 16 und 30 H₂O gemischten Systeme PLG - Imidazol sind in Abb. 37 dargestellt. Die Hydratation der Filme beträgt 1, 3,2 und 10 Moleküle H₂O pro Peptidrest bei den rel. Luftfeuchtigkeiten 92 % (Adsorption), 98 % (Desorption) und 98 % (Desorption noch nicht im Gleichgewicht). In Abb. 37 c ist ein Film in der deuterierten Form trocken und bei 90 % rel. Luftfeuchtigkeit gezeigt.

11.1.1. COOH- und CO₂⁻-Banden und Protontransfer

Mit steigender Hydratation in den Filmen nimmt die Intensität der Banden der Säureform ab und die der Ionenform zu. Die Intensitätsänderungen sind in allen Proben vollständig reversibel, wenn man hinreichend langsam trocknet. Bei dem am stärksten hydratisierten Film sind die Banden der Säureform nicht mehr zu erkennen, und in den Mischungen mit mehr als 8 H₂O findet man ebenfalls nur noch die Banden der Carboxylatstruktur. Den Grad des Protontransfers habe ich nach der νC=O-Bande, bei den stärker hydratisierten Systemen auch mit Hilfe der νC-O-Bande bestimmt. In Tab. 26 sind die νC=O- und νCO₂⁻-Banden und der Protontransfer zusammengestellt, dieser ist in Abb. 38 in Abhängigkeit von der Hydratation dargestellt.

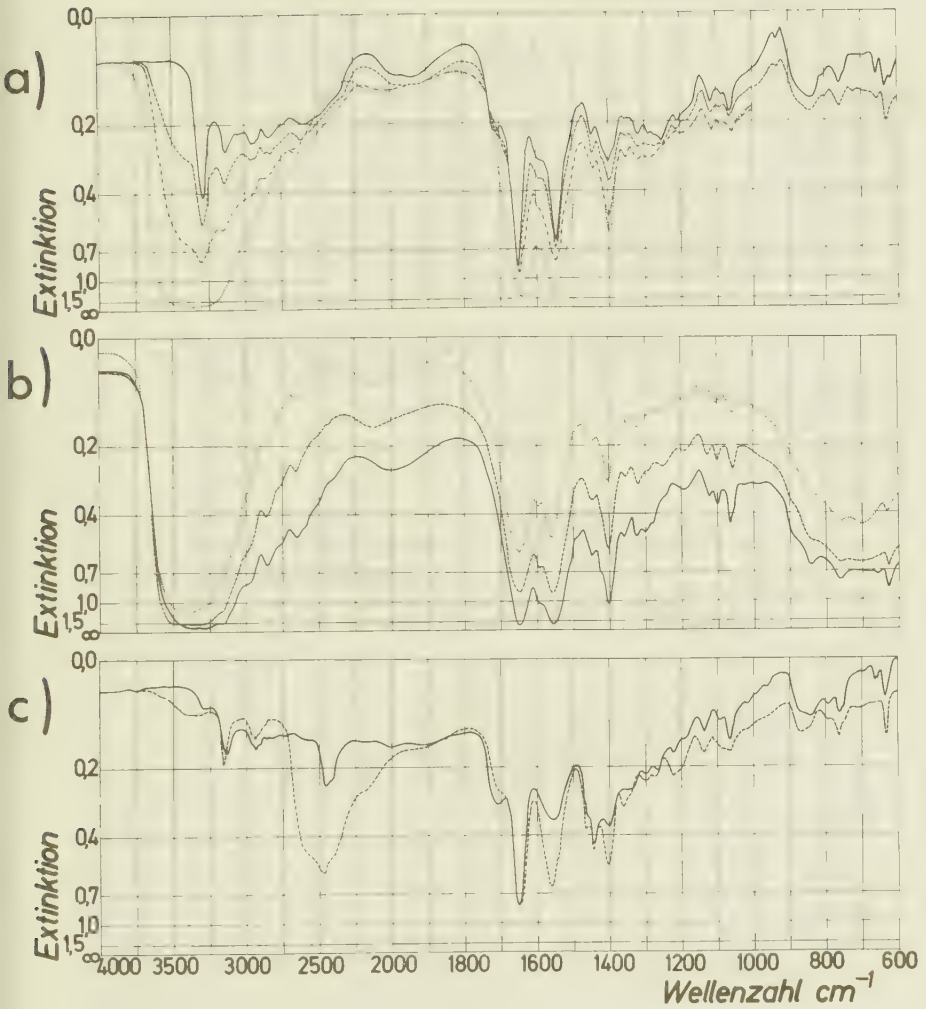


Abb. 37: IR-Spektren von PLG - Imidazol

- a) Filme: —scharf getrocknet; ---hydratisiert mit 1 H_2O , ---mit 3,2 H_2O ,mit 10 H_2O (kurzzeitig)
 b) Mischungen mit n Molekülen H_2O pro² Assoziat:
 — n=8, --- n=16, n=30
 c) PLG - Imidazol-Filme, D-Form:
 —scharf getrocknet; ---90 % rel. Luftfeuchtigkeit, Desorption

	$\nu_{C=O}$	$\nu_{as}CO_2^-$	$\nu_sCO_2^-$	Protontrans- fer (%)
<u>Filme</u>				
scharf	1712 m-s	1555 m-s	1400 m	56
getrocknet				
mit 1 H ₂ O	1710 sh,m	1558 m-s	1400 m-s	65
mit 3,2H ₂ O	1710 sh,w	1560 vs	1400 s	86
mit 10 H ₂ O	1710 sh,w	1560 vs	1400 vs	100
D ₂ O, trocken	1710 m-s	1553 m-s	1400 m	
D ₂ O, feucht	1710 sh,m	1561 vs	1402 s	
<u>Mischungen mit H₂O</u>				
mit 8 H ₂ O	-	1560 s	1402 s	97 *
mit 16 H ₂ O	-	1560 vs	1403 s	100
mit 30 H ₂ O	-	1560 vs	1404 s	100

* nach der $\nu_{C=O}$ -Bande

Tab. 26: $\nu_{C=O}$ - und CO_2^- -Banden und Protontransfer bei PLG - Imidazol in Abhängigkeit von der Hydratation

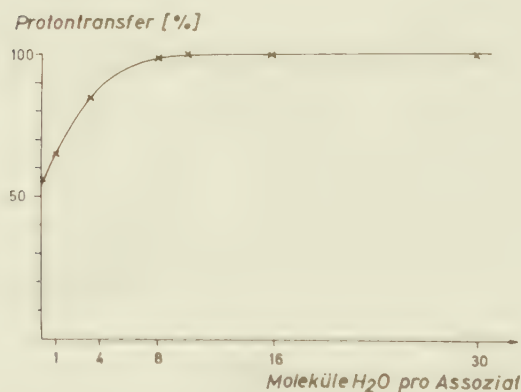


Abb. 38: Protontransfer in PLG - Imidazol + n H₂O

Der Protontransfer nimmt hiernach mit der Hydratation ähnlich zu wie in der Mischung Essigsäure + Imidazol. Der Einfluß des Hydratwassers scheint in dem PLG-Assoziat etwas geringer (vgl. Abb. 10, dort verursacht die Zugabe von 2 H_2O eine Zunahme des Protontransfers von 45 auf 88 %). In dem hier vorliegenden System darf man jedoch die Wassermoleküle nicht berücksichtigen, die sich an die Peptidgruppen anlagern.

Auch im deuterierten System nimmt der Protontransfer mit der Hydratation zu. Dort ist am besten die Zunahme der $\nu_{\text{asCO}_2^-}$ -Bande zu beobachten.

11.1.2. Banden des angelagerten Wassers und Art der Wasseranlagerung

Das System PLG - Imidazol ist sehr wenig hygroskopisch, verglichen mit dem Na-Salz und nur wenig hygroskopischer als reine PLG (vgl. Spektren in (24)). Die OH-Valenzschwingung des angelagerten Wassers finde ich um 3400 cm^{-1} mit einer Schulter bei 3200 cm^{-1} , die wie in den Mischungen der Monomeren der 2 δOH -Schwingung zuzuordnen ist. Nach einem Vergleich mit PLG, wo die OH-Valenzschwingung des angelagerten Wassers bei 3450 cm^{-1} liegt (24), und der Mischung Essigsäure + Imidazol + H_2O mit dieser Bande um 3390 cm^{-1} kann man schließen, daß ein Teil der H_2O -Moleküle relativ kräftig gebunden an die $\text{OH}\cdots\text{N}$ -Brücken bzw. $\text{NH}^+\cdots\text{O}^-$ -Brücken angelagert ist, und ein anderer Teil weniger kräftig gebunden an die O-Atome in den Peptidgruppen. Die große Breite der Bande und ihre Lage bei großen Wellenzahlen würde sich dadurch erklären, daß sich die Absorptionen der beiden Formen überlagern. Die Förderung des Protontransfers durch das direkt an die $\text{OH}\cdots\text{N}$ -Brücken angelagerte Wasser entspricht danach etwa der in den Mischungen der Monomeren.

11.1.2. Veränderungen an den Banden des Imidazols

An den Banden des Imidazols läßt sich der Protontransfer wie in den Systemen Essigsäure + Imidazol + n H₂O leicht qualitativ zeigen. Die Änderung der Banden mit der Wasserzugabe in den Assoziaten mit PLG und Essigsäure entsprechen einander weitgehend. Einige Banden habe ich in Tab. 27 zusammengestellt (Zuordnung nach (58)).

	ν_{13}	ν_8	ν_{18}	ν_{CH}
<u>Filme</u>				
scharf			760 m	3140 sh,m
getrocknet	1595 sh,vw	1063 m	750 sh,w-m	3120 m-s
mit 1 H ₂ O	1595 sh,w	1063 w	760 m	3140 sh,m
		1055 sh,w	750 sh,w	3120 m
mit 3,2 H ₂ O	1595 sh,w	1060 br	760 m	3140 m-s
			750 sh,w	
mit 10 H ₂ O	1595 sh,w-m	1060 br	760 m	3145 m-s
			750 sh,w	
<u>flüssige Mischungen</u>				
mit 8 H ₂ O	1596 sh,w-m	1065 w	756 m	3150 m-s
		1055 sh,w		
mit 16 H ₂ O	1596 sh,m	1065 sh,w	756 m	3150 sh,m
		1055 w		
mit 30 H ₂ O	1596 sh,m	1052 w-m	756 m	3150 sh

Tab. 27: Banden des Imidazols in PLG - Imidazol + n H₂O

11.1.4. Absorptionen der Brücken in der Wasserstoffbrücken im Bereich 3500 - 1700 cm⁻¹

Die breiten Banden im Bereich 3500 - 1700 cm⁻¹ zeigen wie in den Messungen der Assoziaten mit H₂O das Verschwinden der CH...N-Brücken zugunsten der NH⁺...O⁻-Brücken. Bei großer Hydratation verschwindet die Bande um 1650 cm⁻¹, und die Absorption um 2500 cm⁻¹ verschiebt sich zu größeren Wellenzahlen. Dabei entsteht ein kräftiges Submaximum bei 2650 cm⁻¹.

11.2. COOH- und CO₂⁻-Banden und Protontransfer in den anderen PLG - N-Base-Assoziaten in Abhängigkeit von der Hydratation

Bei den anderen PLG - N-Base-Systemen habe ich Filme mit 3,5 - 5 H₂O pro Peptidrest hydratisiert und außerdem flüssige Mischungen mit 30 H₂O pro Rest untersucht. Die rel. Luftfeuchtigkeit und die Hydratation der Filme sind in Tab. 28 zusammengestellt.

	rel. Luftfeuchtigkeit	Hydratation Moleküle H ₂ O /Rest
PLG - n-Propylamin	92 % (Adsorption)	5
PLG - Picolylamin	92 % (")	3,5
PLG - 2-Äthylimidazol	92 % (")	4,1
PLG - Imidazol	98 % (Desorption)	3,2
PLG - 3-Aminopyridin	98 % (")	5
PLG - Na-Salz	92 % (Adsorption)	9,5

Tab. 28: Hydratation der PLG - N-Base-Filme

Die Assoziante PLG - n-Propylamin (Abb. 39 a) und PLG - Picolylamin (Abb. 39 b) zeigen schon im wasserfreien Zustand nur CO₂⁻-Banden und keine COOH-Banden, also 100 % Protontransfer. Bei der Hydratation tritt nur eine leichte Verschiebung der ν_{as} CO₂⁻-Bande zu höheren Wellenzahlen auf. Diese Verschiebungen sind weniger ausgeprägt als bei den Modellsystemen (und auch geringer als bei Änderung der Sekundärstruktur bei PLG - n-Propylamin). Die NH⁺...O⁻-Brücken bleiben danach erhalten und werden nur wenig geschwächt.

Die Systeme PLG - 2-Äthylimidazol (Abb. 39 c) und PLG - 3-Aminopyridin (Abb. 39 d) zeigen bei Hydratation in ähnlicher Weise eine Zunahme des Protontransfers wie PLG -

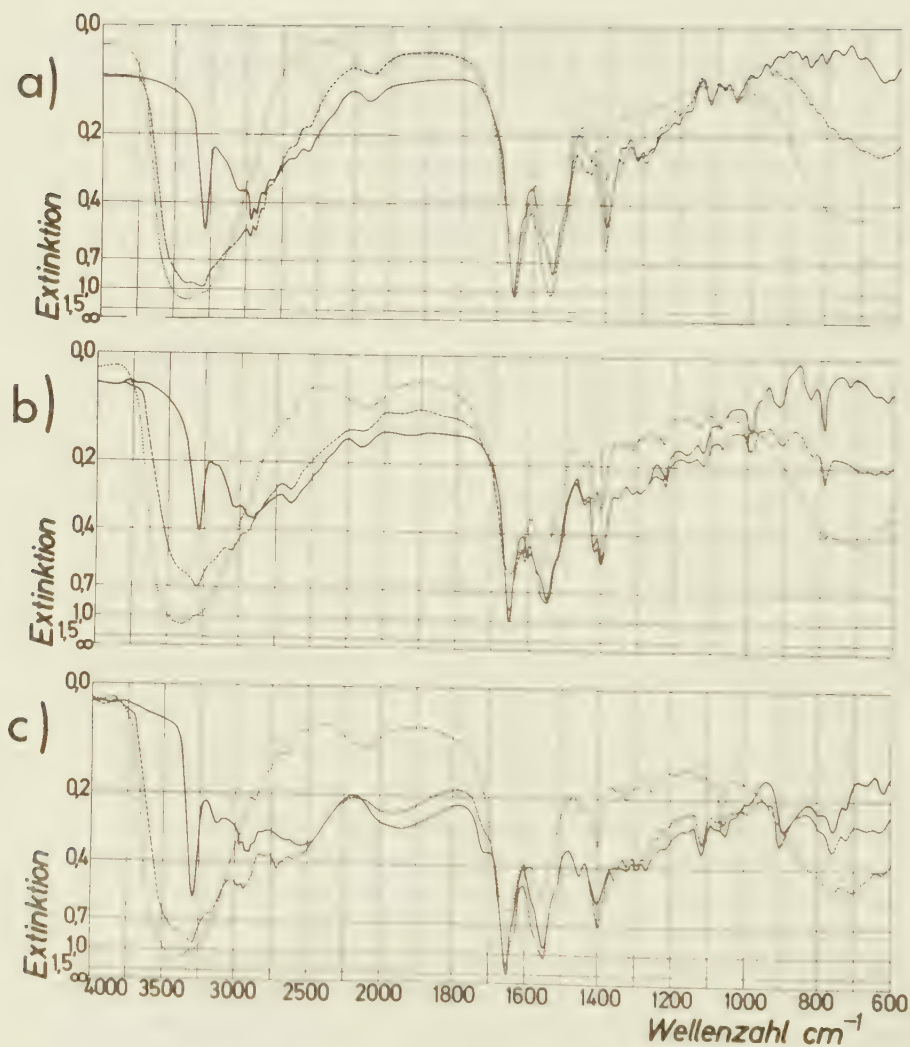


Abb. 39: IR-Spektren von PLG - N-Base-Assoziaten:
 — scharf getrocknete Filme, --- hydratisierte Filme,
 Lösung in 30 H₂O pro Peptidrest
 a) PLG - n-Propylamin b) PLG - Picolylamin
 c) PLG - 2-Athylimidazol

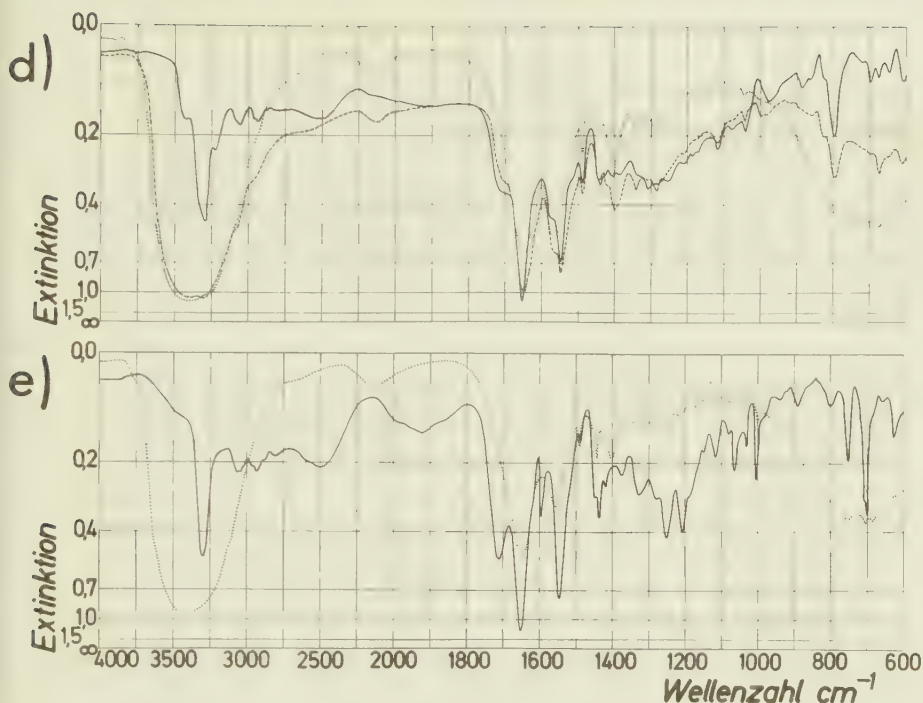


Abb. 39: IR-Spektren von PLG - N-Base-Assoziaten:
 — scharf getrocknete Filme, --- hydratisierte Filme,
 Lösung in 30 H₂O pro Peptidrest
 d) PLG - 3-Aminopyridin e) PLG - Pyridin

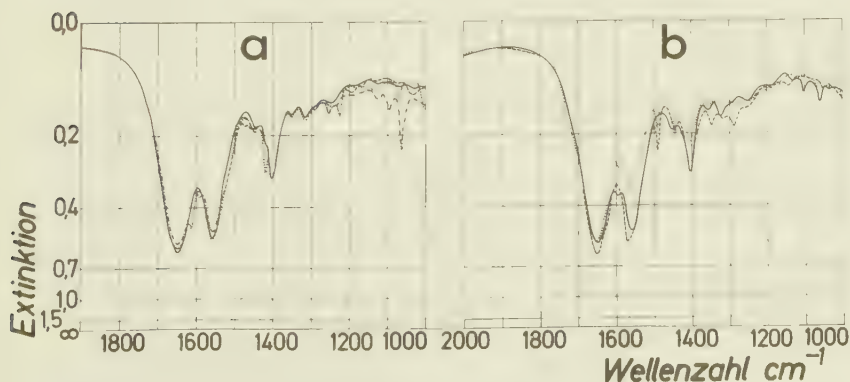


Abb. 40: IR-Spektren von PLG - N-Base-Assoziaten mit
 30 H₂O pro Peptidrest a) — Na-PLG, --- PLG-n-Propyl-
 amin, ... PLG-Picolylamin, - - PLG-2-Athylimidazol
 b) — PLG-Imidazol, --- PLG-3-Aminopyridin,
 ... PLG-Pyridin

Imidazol. In den Filmen nimmt die Intensität der $\nu\text{C=O}$ -Bande beim Übergang vom trockenen zu dem mit ca. 4 H_2O hydratisierten System ab und die Intensität der CO_2^- -Banden zu. Die Verschiebungen in der Lage der Banden sind wie oben geringer als bei den Mischungen mit Essigsäure. In den Assoziaten mit 30 H_2O liegt vollständiger Protontransfer vor, man beobachtet keine Banden der COOH -Gruppen mehr.

Im Assoziat PLG - Pyridin (Abb. 39 e) liegt bei Bzw. von 30 H_2O fast vollständiger Protontransfer vor, während im trockenen Film kein Protontransfer zu beobachten ist. In Abb. 40 ist die $\nu\text{C=O}$ -Bande als Schulter noch deutlich zu erkennen, wenn man mit den anderen Systemen mit 30 H_2O vergleicht. Die CO_2^- -Banden sind in der Mischung mit 30 H_2O kaum weniger intensiv als in den Mischungen mit den stärkeren Basen. Im Fall PLG - Pyridin ist die Änderung des Protontransfers beim Übergang vom trockenen zum mit 30 H_2O hydratisierten System am größten, das entspricht den Verhältnissen bei den Mischungen mit Essigsäure. Eine Mischung mit 16 H_2O zeigte ca. 40 % Protontransfer, jedoch war das Assoziat nicht vollständig gelöst.

		$\nu\text{C=O}$	$\nu_{\text{as}}\text{CO}_2^-$	$\nu_{\text{s}}\text{CO}_2^-$
PLG -	trocken	-	1565 vs	1400 s
n-propylamin	1 H_2O	-	1560 vs	1400 s
(α -Struktur)	30 H_2O	-	1559 vs	1402 s
PLG -	trocken	-	1560 s	1399 s
Picolylamin	3,5 H_2O	-	1560 vs	1402 s
	30 H_2O	-	1560 vs	1403 s
PLG -	trocken	1711 sh,m	1560 m-s	1400 m
2-Äthylimidazol	4,1 H_2O	1712 sh,w	1560 vs	1400 s
	30 H_2O	-	1560 vs	1403 s
PLG -	trocken	1700 sh,s	1560 m	verbleibt
3-Aminopyridin	5 H_2O	1705 sh,w	1560 vs	1402 s
	30 H_2O	-	1560 vs	1403 s
PLG -	trocken	1710 s	-	-
Pyridin	30 H_2O	1710 sh,w	1560 vs	1404 s

Tab. 29: C=O - und CO_2^- -Banden in den Assoziaten
PLG - N-Base² + n H_2O

Zusammenfassend ergibt sich, daß auch in diesen Systemen der Protontransfer durch die Anwesenheit von Wassermolekülen begünstigt wird.

Die Banden des angelagerten Wassers liegen ähnlich wie im System PLG - Imidazol + $n \text{ H}_2\text{O}$, was ich als Beispiel ausführlich behandelt habe. Die Banden der Basen zeigen bei der Hydratation ähnliche Verschiebungen wie in den Modellsystemen, ebenso verhalten sich auch die "A-, B- und C-Banden.

11.3. Reversible hydratationsabhängige Strukturumwandlung bei PLG - n-Propylamin

Schon weiter oben habe ich festgestellt, daß ein PLG - n-Propylaminfilm bei langsamer Trocknung eine β -Struktur ausbildet (Abb. 33 a). Dies geschieht bei 25°C und rel. Luftfeuchtigkeiten zwischen 42 und 92 % in 2 - 3 Tagen. Dabei beträgt die Hydratation 1 - 3 Moleküle H_2O pro Rest. Die β -Struktur wird schnell zerstört bei wesentlich größerer Hydratation in gesättigter Luftfeuchtigkeit oder bei Zugabe von Wasser. Dabei entsteht wieder die α -helikale Struktur, die bei Hydratation mit mehr als 5 H_2O stabil ist. Es liegt also in Abhängigkeit von der Hydratation eine reversible Konformationsumwandlung des Polypeptidrückgrats vor, ähnlich wie im Na- und K-Salz. Die Amidbanden, die die Konformation anzeigen, sind in Tab. 30 zusammengestellt.

	Amid A	Amid I	Amid II	Amid V
<u>α-Helix</u>				
trocken	3288	1655	1549	n.i.
mit 5 H_2O	3288	1652	1551	n.i.
mit 30 H_2O^*	verdeckt	1652**	1550**	verdeckt
<u>β-Struktur</u>				
trocken	3280	1692 1622	1530	705
mit 2 H_2O	3278	1692 1622	1530	710

* vermutlich Anteile von Knäuelstruktur

** von H_2O bzw. V_{asCO_2} überlagert

Tab. 30: Amidbanden bei PLG - n-Propylamin

11.4. Amidbanden und Sekundärstruktur in den Polymeren

PLG - N-Base-Systemen bei Hydratation

Die Lage der Amidbanden ändert sich bei Hydratation der Filme mit etwa 4 H₂O nur in wenigen Fällen um einige Wellenzahlen (Tab. 31). Danach findet man dabei keine Änderung der Sekundärstruktur.

	Amid A	Amid I	Amid II	Amid V
PLG - Picolylamin	3290 (± 0)	1652 (-2)	1550 (+1)	655 (± 0)
PLG - 2-Äthylimidazol	3290 (± 0)	1651 (-2)	1550 (+1)	660 (± 0)
PLG - Imidazol	3295 (± 0)	1652 (-2)	1548 (± 0)	n.i.
PLG - 3-Aminopyridin	3295 (± 0)	1653 (± 0)	1551 (± 0)	655 (± 0)

Tab. 31: Amidbanden in den hydratisierten Filmen und Verschiebung gegenüber den scharf getrockneten Filmen

In den Mischungen mit 30 H₂O (Abb. 40) sind die Amid I-Banden durch die Scherenschwingung des Wassers und die Amid II-Banden durch die sehr kräftigen $\nu_{as} \text{COO}^-$ -Banden weitgehend verdeckt. Eindeutig läßt sich jedoch feststellen, daß in keinem Fall ein erheblicher Anteil antiparalleler β -Struktur auftritt. Das wäre an den Amid I- und II-Banden um 1620 bzw. 1530 cm⁻¹ zu erkennen. Das Vorherrschen von α -Helixstruktur kann ebenfalls ausgeschlossen werden, da die Amid II-Bande keine deutliche Schulter bei 1455 cm⁻¹ zeigt. Danach überwiegt die α -helikale Struktur, die sie im Film vorliegt, jedenfalls in diesen konzentrierten Lösungen noch zu einem erheblichen Teil erhalten.

11.5. Protontransfer, Hydratation und Konformation

In Kap.10 habe ich gezeigt, daß eine Hydratation in den PLG- N-Base - Assoziaten den Protontransfer in den $\text{OH}\cdots\text{N}$ Wasserstoffbrücken fördert. Die Mechanismen, die dabei eine Rolle spielen können, habe ich in Teil A geschildert. Darüberhinaus geht aus der Tab. 28 hervor, daß die Assoziante mit zunehmendem ΔpK_a und damit zunehmendem Protontransfer hygroskopischer werden, daß umgekehrt also auch der Protontransfer die Hydratation fördert. Damit sind Hydratation und Protontransfer zwei sich gegenseitig verstärkende Prozesse.

Nun könnte bei diesen Prozessen auch die Sekundärstruktur eine Rolle spielen. In den meisten Systemen finde ich jedoch die gleiche α -helikale Struktur. Eine reversible Konformationsumwandlung zur β -Struktur tritt in Abhängigkeit von der Feuchtigkeit nur im Natrium-, Kalium-*, und Propylaminsalz der PLG auf. Bei den schwächeren Basen habe ich diese Struktur trotz mehrfacher Variation der Luftfeuchtigkeiten nicht gefunden. Die β -Struktur tritt danach nur bei vollständigem Protontransfer mit schon schwächeren $\text{NH}^+\cdots\text{O}^-$ Brücken (oder fehlenden Brücken) auf und zwar im wenig hydratisierten Zustand. Für den Fall weitgehend symmetrischer Brücken dürfte diese Konformationsumwandlung von geringer Bedeutung sein.

* Bei stark hydratisierten Filmen von K-PLG habe ich keine β -Struktur gefunden, diese bildet sich erst allmählich beim Eintrocknen.

12. PLH und das Hydrochlorid

Von PLH liegen ORD-Messungen von Norland et al. (96) und CD-Messungen von Beychock et al. (97) für verdünnte wäßrige Lösungen in Abhängigkeit vom pH vor. Die Autoren schließen, daß zwischen pH 6,0 und pH 3,0 eine Umwandlung der Sekundärstruktur von der α -helikalen zur Knäuelform stattfindet. Norland et al. vermuten im neutralen Bereich linkshändige α -Helix, Beychock et al. schließen auf eine rechtshändige Form. IR-Untersuchungen von Mühlinghaus et al. (90) zeigen, daß in Abhängigkeit von der Protonierung mit HCl in PLH-Filmen ebenfalls eine Strukturumwandlung von der α -Helix in die Knäuelform stattfindet. Aus einer Schulter bei 1680 cm^{-1} schließt Mühlinghaus auf Anteile von antiparalleler β -Struktur im vollständig protonierten Film. Der Autor gibt in (90a) auch eine vollständige Zuordnung der IR-Banden von PLH und PLH-HCl im Bereich $4000 - 650\text{ cm}^{-1}$.

Wie im Fall der PLG habe ich auch hier zur Kontrolle der Proben und zum Vergleich mit den Assoziaten mit den organischen Säuren IR-Spektren von Filmen aus reinem PLH und aus dem Hydrochlorid in Abhängigkeit von der Feuchtigkeit aufgenommen, außerdem ein Spektrum von PLH - HCl in 30 H_2O . Im Folgenden bespreche ich die Amidbanden in diesen Systemen (Zusammenfassung der Banden in Tab. 32). Auf die Banden des Histidinrestes gehe ich nur bei der Diskussion der Assoziat mit den Carbonsäuren ein (s. 13.4. und 13.5.).

Amid I- und II-Banden

α -Helix bei PLH (Abb. 41 a)

Bei PLH finde ich die Amid I-Bande bei 1648 cm^{-1} und die Amid II bei 1542 cm^{-1} in den schnell getrockneten Proben. Das entspricht fast genau den Werten von Mühlinghaus et al. (90) und spricht für rechtshändige α -helikale Struktur (bei linkshändiger Form wird die Amid I-Bande bei höheren Wellenzahlen erwartet, s. 13.1.).

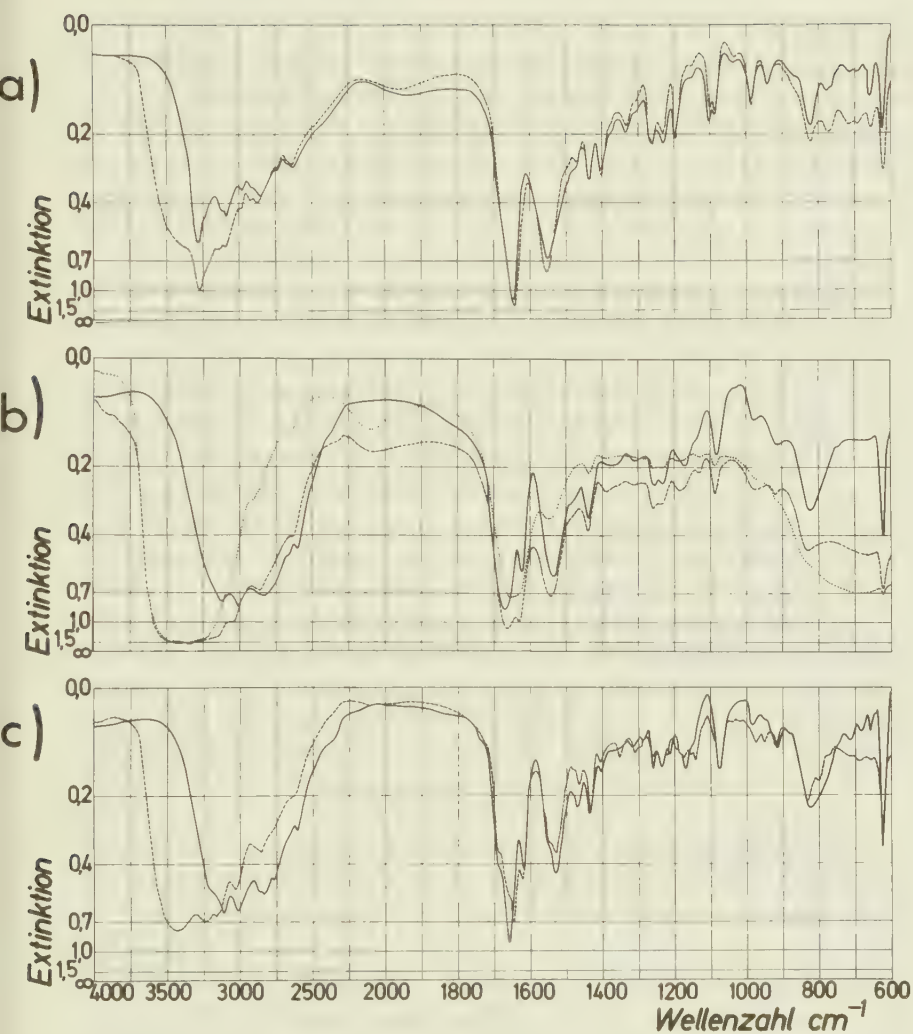


Abb. 41: IR-Spektren von
 a) PLH : --- 90 % rel. Luftfeuchtigkeit,
 — scharf getrocknet
 b) PLH - HCl : --- 98 % rel. Luftfeuchtigkeit,
 — schnell scharf getrocknet, ... mit 30 H_2O
 c) PLH - HCl : --- 90 % rel. Luftfeuchtigkeit,
 — scharf getrocknet

PLH - HCl

Knäuel 1 (Abb. 41 b): Bei den langsam getrockneten Filmen von PLH - HCl erhalte ich Amidbanden in denselben Lagen, wie sie in (90) beobachtet wurden. Die Schwerpunkte liegen bei 1656 und 1528 cm^{-1} für die Amid I- bzw. Amid II-Bande in trockenem Zustand, bei 1643 und 1535 cm^{-1} in der feuchten Form. An der Amid I-Bande treten Schultern um 1680 und 1620 cm^{-1} auf. Aus diesen Banden kann man nur mit Vorbehalt auf β -Struktur-Anteile schließen, da bei 1620 cm^{-1} , wo eigentlich die kräftigste Bande der β -Struktur erwartet wird, auch eine Bande des protonierten Histidinrestes liegt. Diese ist daran zu erkennen, daß sie beim H-D-Austausch nach 1600 cm^{-1} wandert. Neben der Amid I-Bande ist auch die Amid II deutlich aufgespalten mit einem Anteil bei 1550 cm^{-1} , wie es bei Helixbereichen zu erwarten wäre. Ich bezeichne diese Struktur als Knäuel 1, obwohl die Amid I- und II-Banden dafür sprechen, daß es sich um eine Struktur handelt, die auch geordnete Bereiche trägt.

Chirgadse (94) findet bei Poly-L-Lysin - HCl in der Knäuelstruktur neben der Amid I-Hauptbande um 1646 cm^{-1} eine schwächere Bande um 1670 cm^{-1} . Es wäre möglich, daß diese der hier bei 1680 auftretenden entspricht. Eine weitere Deutung der letzteren Bande wäre das Auftreten einer anderen helikalen Struktur. In 14.7. diskutiere ich das System PLH - Ameisensäure, welches die Hauptbande der Amid I bei 1680 cm^{-1} zeigt.

Knäuel 2 (Abb. 41 c): In der Mischung mit $30\text{ H}_2\text{O}$ erhalte ich bei PLH - HCl eine breite Amid II-Bande um 1545 cm^{-1} ; die Amid I ist von der H_2O -Schwingschwingung überlagert, ihr Schwerpunkt liegt um 1655 cm^{-1} mit einer Schulter um 1632 cm^{-1} . Ähnliche Bandenläsen erhält man, wenn man einen Film bei 98 % rel. Luftfeuchtigkeit spektroskopiert. Bei rascher scharfer Trocknung eines solchen Filmes bildet sich die Amid I-Bande nicht wie in Knäuel 1 aus, sondern man erhält sie um 1665 cm^{-1} mit einem Anteil um 1625 cm^{-1} . Die Amid II-Bande dagegen liegt etwa wie oben um 1532 cm^{-1} , aber mit einer Schulter bei größeren Wellenzahlen. Nach der fortgeschrittenen Verbreiterung der Amid A-Bande liegt in diesen Fällen weitgehend Knäuelstruktur vor.

Hydratationsabhängige Konformationsumwandlung bei PLH-HCl

Zwischen 90% und 98% relativer Luftfeuchtigkeit finde ich also eine Umwandlung der Konformation von der Knäuel 1- in die Knäuel 2-Form. Diese Umwandlung ist in Abhängigkeit von der Feuchtigkeit reversibel.

Amid A-Bande

Bei PLH liegt die Amid A-Bande bei 3290 cm^{-1} , sie ist relativ scharf ausgebildet, wie bei einer α -helikalen Struktur zu erwarten ist.

Bei PLH - HCl liegt die Amid A-Bande in Knäuel 1 um 3220 cm^{-1} und ist zu kleineren Wellenzahlen hin stark verbreitert. In der Knäuel 2-Form ist bei 3220 cm^{-1} nur noch eine breite Schulter angedeutet. Der Schwerpunkt der Bande liegt bei kleineren Wellenzahlen, überlagert von CH-Banden. Mühlinghaus (90 a) vermutet, daß die Verbreiterung zum Teil von der Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen Peptidgruppe und Anion der Form $\text{NH}\cdots\text{Cl}^-$ herührt. Es wird sich zeigen, daß diese Veränderung der Amid A-Bande auch bei Bildung anderer PLH - Säure-Assoziate entsteht.

rel. Luft- feuchtigkeit	Amid A	Amid I	Amid II	
<u>PLH</u>				
90 % H_2O	3290 s	1644 vs	1555 s	α -Helix
trocken*	3290 s	1648 vs	1552 s	"
<u>PLH - HCl</u>				
Mischung mit 30 H_2O	verdeckt	1655 vs	1545 s	Knäuel 2
98 % H_2O	3200 vbr	1655 vs	1545 s	"
trocken	3200 vbr	1665 vs	1532 s	"
90 % H_2O	3220 br	1680 sh 1654 vs	1535 s	Knäuel 1
trocken	3220 br	1680 sh 1643 vs	1528 s	"

* trocken bedeutet: von der darüber stehenden rel. Luftfeuchtigkeit aus schnell scharf getrocknet

Tab. 32: Amid A-, I- und II-Banden bei PLH und PLH - HCl

Amid V-Bande

PLH zeigt im Bereich der Amid V-Bande eine schwache Absorption um 693 cm^{-1} , die der Amid V zuzuordnen ist (90 a). Bei PLH-HCl liegt diese Bande in der Knäuel 1-Struktur bei ähnlichen Wellenzahlen, bei 694 in der trockenen und bei 684 cm^{-1} in der feuchten Form. Eine derartige Bande ist in der Knäuel 2-Struktur nicht erkennbar ausgebildet. Die Amid V-Bande zeigt danach nicht die nach (87) zu erwartende Abhängigkeit von der Sekundärstruktur.

13. Abhängigkeit des Protontransfers vom ΔpK_a bei Assoziaten von PLH mit Carbonsäuren

Die Abhängigkeit des Protontransfers vom ΔpK_a soll wie im Fall der PLG-Systeme an Hand der scharf getrockneten Proben diskutiert werden. Bei den Assoziaten mit Essigsäure und Ameisensäure sind dies die mit den Säuren bedampften trockenen Filme. Die Spektren sind in Abb. 42 zusammengestellt. Wie bei den PLG-Systemen bespreche ich zunächst die Sekundärstruktur an Hand der Amidbanden. Es wird sich herausstellen, daß mit dem Protontransfer auch Änderungen der Sekundärstruktur zusammenhängen.

13.1. Amid-Banden und Sekundärstruktur

Die Amid III- und V-Banden sind in den meisten Fällen von kräftigeren Banden der Säuren verdeckt, ich gehe daher in erster Linie auf die Amid A, Amid I und II - Banden ein. Diese sind in Tab.33 zusammengestellt.

Helix-Struktur bei PLH-Trichloressigsäure und PLH-Dichloressigsäure

In diesen Assoziaten liegt die Amid I-Bande bei 1670 bzw. 1672 cm^{-1} und die Amid II um 1560 cm^{-1} . Ähnliche Bandenlagen fanden Norland et al. (96), die Gefriergetrocknetes PLH-Dichloressigsäuresalz in Nujol untersucht haben.

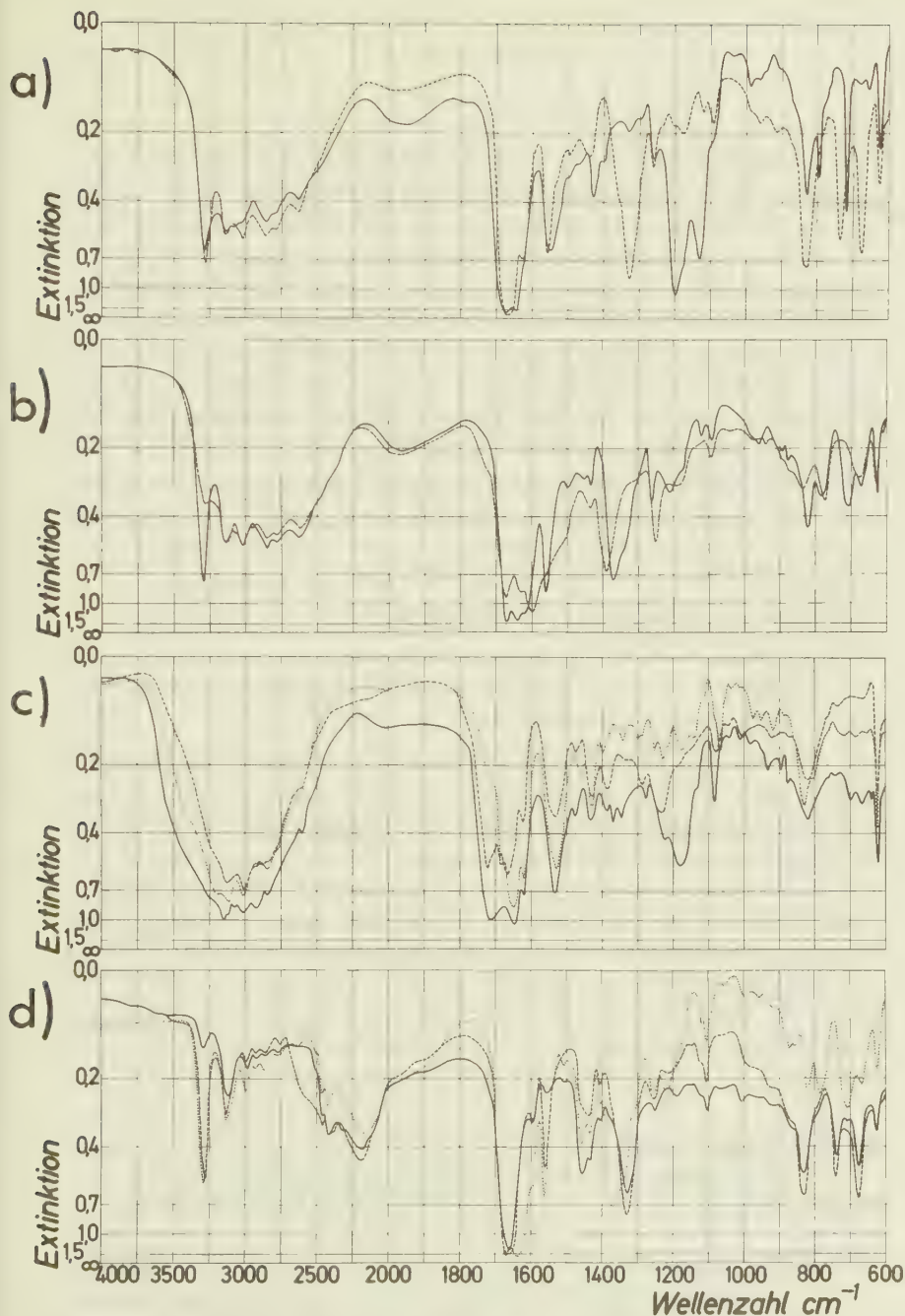


Abb.42: IR-Spektren von Assoziaten des PLH mit a) — Trifluoressigsäure, -- Trichloressigs., b) — Dichloressigs., -- Monochloressigs., c) — Ameisensäure und -- Essigs.; c) ... PLH + wenig Ameisensäure; d) — PLH-Trichloressigs., D-Form; -- PLH-Trichloressigs., H-D-Austausch; ... PLH-Dichloressigs., H-D-Austausch

Diese Autoren haben nach den IR-Spektren und ORD-Daten vermutet, daß eine α -helikale Struktur vorliegt. Dazu diene ihnen auch der Vergleich mit dem Dichloressigsäure-Salz von Poly-1-Benzyl-L-Histidin; bei dieser Substanz haben die Autoren die Proben ausrichten können und durch den IR-Dichroismus helikale Struktur nachweisen können. Überraschend ist aber die hohe Lage der Amid I-Bande im Gegensatz zur α -Helix des PLH. Nun finden Bradbury et al. (98,99) bei Estern der Poly-L-Asparaginsäure die Amid I-Bande bei 1665 cm^{-1} * und die Amid II bei 1557 cm^{-1} . Nach weiteren Untersuchungen dieser Autoren mit ORD und Röntgenbeugungsmethoden liegt bei diesen Substanzen eine linkshändige α -Helix vor.** Danach scheint es möglich, daß es sich in den vorliegenden Assoziaten ebenfalls um eine derartige Helix handelt, wor. bezeichnen diese Struktur als Helix 2.

Die Amid A-Bande liegt in den Assoziaten bei 5240 cm^{-1} und ist sehr scharf ausgebildet.

Für das Trichloressigsäure-Salz sind in Tab.33 auch die Banden der D-Form angegeben (Abb.42d). Die Banden zeigen die erwarteten Verschiebungen. Der H-D-Austausch in den Peptidgruppen benötigt bei diesem Assoziat bei 25°C und 90% rel. Luftfeuchtigkeit etwa 8 Tage, beim PLH-Dichloressigsäure-Salz benötigt der vollständige Austausch unter gleichen Bedingungen mehr als 14 Tage. Das bestätigt, daß eine helikale Struktur vorliegt und zeigt, daß diese beim Assoziat PLH-Dichloressigsäure besonders stabil ist. Man sieht dies auch an der Schärfe der Amid-Banden.

PLH-Trifluoressigsäure

In dem System PLH-Trifluoressigsäure ist die Amid I-Bande mehrfach aufgespalten. Eine kräftige Bande liegt bei

* Wen und Woody (100) geben mit diesem und anderen Werten einen empirischen Zusammenhang zwischen der Lage der Amid I-Banden in helikalen Strukturen und Bindungswinkeln.

** In einer ω -Helix (4_{13} -Helix) dagegen wird zwar die Amid I-Bande wie in den vorliegenden Spektren gefunden, die Amid II aber bei 1535 cm^{-1} (99)(99a).

1647 cm^{-1} , eine andere, überlagert mit der $\nu_{\text{as}}\text{CO}_2^-$ -Bande, um 1674 cm^{-1} , außerdem tritt bei 1690 cm^{-1} eine schwache Schulter auf. Die Amid II-Bande finde ich bei 1552 cm^{-1} mit einer Schulter bei 1530 cm^{-1} . Die Amid A liegt bei 3293 cm^{-1} und ist scharf ausgebildet. Nach der Halbwertsbreite dieser Bande sollte eine weitgehend geordnete Struktur vorliegen. Nach der Amid I-Bande um 1674 cm^{-1} handelt es zum Teil um eine "Helix 2" wie in den oben besprochenen Assoziaten. Die schwächeren Amid I-Banden bei 1647 und 1690 cm^{-1} zusammen mit der Amid II-Schulter bei 1530 cm^{-1} zeigen weiter einen erheblichen Anteil einer Struktur, die ich beim Hydrochlorid als Knäuel 1 bezeichnet habe.

	Amid A	Amid I	Amid II	Sekundärstruktur
PLH - Trifluoressigsäure	3293 s	1690 sh 1674 s* 1647 s	1552 s	Helix 2 + Knäuel 1
PLH - Trichloressigsäure	3290 s 3280 sh	1670 vs*	1559 s	Helix 2
PLH - Dichloressigsäure	3290 s	1672 vs	1562 s	Helix 2
PLH - Monochloressigsäure	3282 m 3250 vbr	1672 vs	1560 sh,m 1530 sh,m	Helix 2 +Knäuel
PLH - Ameisensäure	3250 vbr	verdeckt 1648 vs	1538 s	Knäuel 1
PLH - Essigsäure	3250 vbr	1690 sh 1667 vs	1550 sh,w 1530 s	Knäuel 2

PLH - Trichloressig- säure, D-Form	2420 s	1670 vs*	1445 s	Helix 2

* von $\nu_{\text{as}}\text{CO}_2^-$ überlagert

Tab. 33: Amidbanden und Sekundärstruktur in den PLH - Carbonsäure-Assoziaten

Knäuel-Strukturen

In langsam getrockneten Filmen von PLH - Monochloressigsäure und bei Bedampfung der neutralen PLH-Filme mit

Ameisen- oder Essigsäure erhalte ich Spektren, in denen die Amid A-Bande wie im Fall PLH - HCl nicht als charakteristische scharfe Bande um 3290 cm^{-1} auftritt, sondern zu kleineren Wellenzahlen verschoben und stark verbreitert oder in der Intensität geschwächt ist. Bei PLH - Monochloressigsäure ist die Bande noch in mittlerer Stärke bei 3233 cm^{-1} zu erkennen. Aus dem Verschwinden der scharfen Amid A-Bande schließe ich auf weitgehend knäuelartige Strukturen, die sich aber nach der Lage der Amid I- und II-Banden in den verschiedenen Assoziaten noch unterscheiden. Bei PLH - Monochloressigsäure liegt die Amid I-Bande bei 1672 cm^{-1} , im Fall der Ameisensäure bei 1649 cm^{-1} und bei PLH - Essigsäure bei 1667 cm^{-1} . In den beiden letzten Assoziaten ist bei 1690 cm^{-1} eine schwache Bande bzw. Schulter zu erkennen, ähnlich wie beim Hydrochlorid. Die Amid II-Bande ist bei PLH - Monochloressigsäure aufgespalten in eine Bande bei 1560 und eine bei 1530 cm^{-1} , in den Assoziaten mit Ameisensäure und Essigsäure liegt sie bei 1545 cm^{-1} bzw. 1550 cm^{-1} mit einer schwachen Schulter bei größeren Wellenzahlen. Diese Banden sprechen im Fall der Monochloressigsäure für große Bereiche der helikalen Struktur wie bei der Dichlor- und Trichloressigsäure (Helix 2), im Fall der Ameisensäure für eine Struktur wie Knäuel 1 im Hydrochlorid und bei PLH - Essigsäure für Knäuel 2.

13.2. COOH- und CO_2^- -Banden der Carbonsäuren und Protontransfer

In Tab. 34 habe ich die COOH- und die CO_2^- -Banden der Carbonsäuren in den Assoziaten mit PLH im Bereich $2000 - 1000\text{ cm}^{-1}$ zusammengestellt. An Hand dieser Banden will ich den Protontransfer in den einzelnen Systemen diskutieren.

	$\nu \text{C=O}$	$\nu \text{C-O}$	$\nu_{\text{as}} \text{CO}_2^-$	$\nu_{\text{s}} \text{CO}_2^-$
PLH - Trifluoressigsäure	-	-	1675 vs	1430 w
PLH - Trichloressigsäure	-	-	1660 vs*	1329 vs
PLH - Dichloressigsäure	-	-	1640 vs	1370 vs
PLH - Monochloressigsäure	1720 w	n.i.	1598 vs	1392 vs
PLH - Ameisensäure	1720 vs	1182 vs	n.i.	1370 w
PLH - Essigsäure	1725 vs	1240 s	-	-

* von Amid I überlagert

Tab. 34: COOH- und CO_2^- -Banden in den PLH - Carbonsäure-Assoziaten

PLH - Trifluoressigsäure, PLH - Trichloressigsäure,
PLH - Dichloressigsäure, PLH - Monochloressigsäure

In den Filmen mit Trifluoressigsäure, Trichloressigsäure und Dichloressigsäure sind nur CO_2^- - und keine COOH- -Banden vertreten. Das bedeutet, daß in diesen Filmen das Proton vollständig zum Histidinrest übergetreten ist. In dem Assoziat mit Monochloressigsäure beobachtet man außer den kräftigen CO_2^- -Banden auch eine schwache $\nu \text{C=O}$ -Bande, die als Schulter an der Flanke der Amid I-Bande zu erkennen ist. In diesem System liegt also nur fast vollständiger Protontransfer vor.

Die Lage der CO_2^- -Banden ist, verglichen mit der in den Na-Salzen (39a), um einige Wellenzahlen verschoben. Dabei wandern die beiden Banden mit fallendem ΔpK_a auseinander, bei den 4 Säuren, nach fallender Säurestärke angeordnet, um 2, 8, 14 bzw. 15 Wellenzahlen jeweils im Vergleich zum Na-Salz. Der Schwerpunkt der Banden ist mit Ausnahme des Dichloressigsäuresalzes, wo er etwa gleich bleibt, um 15 - 20 Wellenzahlen zu kleineren Wellenzahlen verschoben. Diese Effekte sind durch die Wirkung der Wasserstoffbrückenbindung $\text{NH}^+ \cdots \text{O}^-$ gut zu erklären (Teil A, 3.1.).

PLH - Ameisensäure

In dem Film in Abb. 42 c (durchgezogene Linie) sind 135 % Ameisensäure adsorbiert. Beim Auftreten von Protontransfer zum PLH werden CO_2^- -Banden um 1600 und um 1550 cm^{-1} erwartet. Eine schwache $\nu_{\text{as}}\text{CO}_2^-$ -Bande beobachtet man bei 1345 cm^{-1} , das entspricht der Lage in dem Assoziat mit Imidazol. Die $\nu_{\text{as}}\text{CO}_2^-$ -Bande ist so schwach, daß sie durch die Banden des PLH verdeckt wird. Nach der Intensität dieser Banden der Ionenform ist in diesem System also trotz des Säureüberschusses nur sehr wenig Protontransfer zu beobachten. Entsprechend beobachtet man kräftige COOH-Banden. Die $\nu\text{C=O}$ -Bande liegt bei 1720 cm^{-1} , und die δOH -Bande bei 1360 cm^{-1} , ähnlich wie in der flüssigen Säure. Um 20 Wellenzahlen zu kleineren Wellenzahlen verschoben ist dagegen die $\nu\text{C-O}$ -Bande, sie liegt bei 1182 cm^{-1} . An dieser veränderten Bandenlage ist deutlich zu sehen, daß die Ameisensäure an das PLH gebunden ist.

PLH - Essigsäure

In dem Film in Abb. 42 c sind 130 % Essigsäure adsorbiert. Bei Übertritt des Protons zum PLH werden hier CO_2^- -Banden um 1565 und 1404 cm^{-1} erwartet, solche Banden sind jedoch nicht zu erkennen. Es hat also trotz des Säureüberschusses kein Protontransfer stattgefunden. Wie im Fall der Ameisensäure sind kräftige COOH-Banden der Säure zu beobachten, die $\nu\text{C=O}$ -Bande bei 1720 cm^{-1} , die $\nu\text{C-O}$ -Bande bei 1240 cm^{-1} und die δOH -Bande bei 1365 cm^{-1} . Während also die $\nu\text{C=O}$ -Bande wie in den Dimeren liegt, sind die $\nu\text{C-O}$ - und δOH -Banden um 50 bzw. 30 Wellenzahlen zu kleineren Wellenzahlen verschoben. Verglichen mit Assoziaten der Essigsäure mit den monomeren Basen (Tab. 5) tritt eine besonders große Verschiebung der $\nu\text{C-O}$ -Bande auf. An diesen Banden ist wie bei der Ameisensäure die Bindung an das PLH zu erkennen.

13.3. Quantitative Bestimmung des Protontransfers

Bei den oben besprochenen Systemen war nur in zwei Fällen, bei PLH - Monochloressigsäure und bei PLH - Ameisensäure, teilweiser Protontransfer eingetreten, in allen anderen Fällen entweder kein oder 100% Protontransfer. Die Berechnung des Ausmaßes an Protontransfer habe ich durch Ausmessung der Intensität der $\nu\text{C=O}$ -Bande im Verhältnis zur $\nu\text{C=O}$ -Bande im System PLH - Essigsäure vorgenommen. Wegen der unterschiedlichen Schichtdicken und Substanzen war wie bei den PLG-Filmen eine Korrektur notwendig, dazu diente mir die Amid I-Bande (vgl. 10.3.). Für den Protontransfer im System PLH - Ameisensäure habe ich die Intensität der $\nu_{\text{as}}\text{CO}_2^-$ -Bande ausgemessen und mit der im System Imidazol - Ameisensäure verglichen. Die erforderlichen Korrekturen habe ich mit Hilfe der δCH -Bande bei 1095 cm^{-1} bei Imidazol bzw. 1090 cm^{-1} beim Imidazolrest vorgenommen. Von diesen Banden kann man annehmen, daß die Intensitäten als Maß verwendet werden können. Damit ergibt sich 93 % Protontransfer im System PLH - Monochloressigsäure und 15 % Protontransfer im System PLH - Ameisensäure. Die Abhängigkeit des Protontransfers vom ΔpK_a ist in Abb. 44 dargestellt.

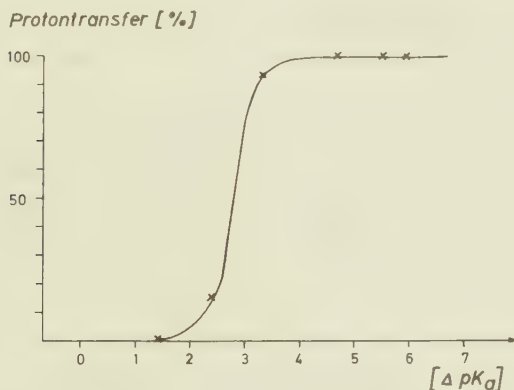


Abb. 44: Protontransfer in PLH - Carbonsäure-Assoziaten in Abhängigkeit vom ΔpK_a

50 % Protontransfer werden danach bei einem ΔpK_a von 2,8 erwartet. Dies entspricht den Verhältnissen in den Modellsubstanzen, dagegen liegt der Wert etwas höher als bei den PLG - Base -Assoziaten.

Stellt man die Änderungen der Sekundärstruktur an Hand der Amid II- oder Amid A-Bande dar, so erhält man ähnliche Diagramme (Abb.45).

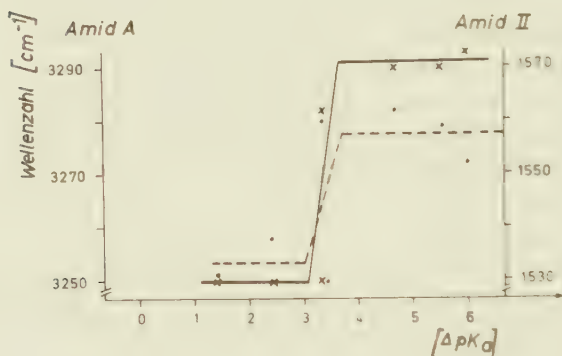


Abb. 45: Amid A-Banden (—) und Amid II-Banden (---) in PLH - Carbonsäure-Assoziaten in Abhängigkeit vom ΔpK_a

Der Vergleich mit Abb. 44 zeigt, daß Protontransfer und Sekundärstrukturänderung parallel erfolgen, diese Vorgänge hängen also eng zusammen. Nun wird bei dem ΔpK_a -Wert um 2,8 der Protontransfer zum Histidinrest durchaus erwartet, die Strukturumwandlung ist in den vorliegenden Systemen offenbar eine Folge des Protontransfers. Andererseits stabilisiert die Konformation im Falle PLH - Ameisensäure auch die Lokalisation des Protons an der Säure. Dies ist nach dem relativ steilen Anstieg des Protontransfers mit dem ΔpK_a zu vermuten, in Kap. 14.7. komme ich darauf zurück.

Durch derartige Effekte kann der Wert des ΔpK_a für 50 % Protontransfer durchaus um 0,2 - 0,5 zu größeren Werten verschoben sein.

13.4. Banden des Histidinrestes

Die Banden des Histidinrestes zeigen in allen Systemen die Wechselwirkungen mit den monomeren Säuren an. Dies ist durch einen Vergleich mit den Banden des reinen PLH festzustellen, insbesondere an der Bande bei 1620 cm^{-1} . Beim Protontransfer von den Carbonsäuren zum Histidinrest treten ähnliche Effekte auf, wie in den Mischungen dieser Säuren mit Pyridin und Imidazol. Die Banden des Histidinrestes ändern sich mit dem Protontransfer nicht in allen Fällen parallel zu den Banden der Säuren. Manche Banden ändern sich erst mit weitgehendem Protontransfer, dagegen entsteht die kräftige Bande der protonierten Form bei 1620 cm^{-1} schon bei der Anlagerung von Ameisensäure und Essigsäure, obwohl kaum bzw. kein Protontransfer beobachtet wird. Die Bande zeigt danach schon die Bildung einer kräftigen Wasserstoffbrücke an. Als Maß für den Protontransfer sind die Änderungen der Banden daher ähnlich wie bei den Modellsubstanzen schwer auszuwerten.

Bei den vorliegenden Systemen kommt ein weiterer Effekt hinzu: Viele Banden der Seitengruppe ändern sich unabhängig von der Protonierung auch mit der Konformation, das Ausmaß dieser Veränderungen entspricht etwa dem bei der Protonierung.* In beiden Fällen verschieben sich die Banden um einige Wellenzahlen oder verändern sich ein wenig in ihrer Intensität. Da sich häufig Protontransfer und Konformation gleichzeitig ändern, wird die quantitative Auswertung zusätzlich kompliziert. In Tab. 35 habe ich das Verhalten

* Dies erklärt auch, daß die Bandenänderungen bei der schrittweisen Protonierung durch HCl in (90 a) nicht ganz parallel mit dem Protonierungsgrad verlaufen, auch einige Änderungen mit der Hydratation bei PLH - HCl sind dadurch zu erklären.

von drei gut zu beobachtenden Banden des Histidinrestes mit der Lage der Amidbanden verglichen.

	<u>unprotoniert</u>		<u>protoniert</u>	
	α -Helix ^{a)}	Knäuel 1 ^{b)}	Helix 2 ^{c)}	Knäuel 1 ^{d)}
Amid A	3290	3250 br	3285-95	3250 br
Amid I	1648	1643	1670-72	1643
Amid II	1552	1525	1559-62	1530
R ₂ *	1474	1461	1490-97	1465
δ CH	1089	1069	1091-94	1071
R ₇	624	625	627-30	622

- a) rechtshändige α -Helix, reines PLH
b) PLH nach Adsorption geringer Mengen Ameisensäure
c) vermutlich linkshändige α -Helix; PLH-Trichloressigsäure, PLH - Dichloressigsäure und PLH - Monochloressigsäure mit Säureüberschuß (14.7.)
d) PLH - HCl bei 90 % rel. Luftfeuchtigkeit
* Zuordnung nach (90 a)

Tab. 35: Abhängigkeit der Banden des Histidinrestes von der Sekundärstruktur

Im Fall der δ CH-Bande ist hiernach der Einfluss der Konformation größer als der der Protonierung. Bei der Diskussion der Systeme PLH - Essigsäure + n H₂O gehe ich noch auf einige weitere Banden des Histidinrestes ein, mit deren Hilfe sich der Protontransfer gut verfolgen läßt.

13.2. Absorptionen der Gruppen in den Wasserstoffbrücken

In dem Bereich der Absorptionen, die durch die OH...N- bzw. NH⁺...O⁻-wasserstoffbrücken verursacht werden, treten auch die Valenzschwingungen der NH-Gruppen des Histidinrestes bei PLH und PLH - HCl auf. Diese liegen im Falle des PLH im Bereich 2400 - 2600 cm⁻¹. Die NH-Gruppen sind offenbar über kräftige Wasserstoffbrücken mit benachbarten Gruppen verknüpft. Der Schwerpunkt der Valenzschwingungsbande

liegt um 2800 cm^{-1} , während die Submaxima bei $2800 - 2600\text{ cm}^{-1}$ Kombinationsschwingungen bzw. Oberschwingungen des Histidinrestes zuzuordnen sind, die durch Fermiresonanz wie beim assoziierten Imidazol (103) an Intensität gewinnen. Bei Protonierung mit HCl bilden sich zusätzlich zu den vorhandenen NH-Gruppen Gruppierungen der Form $\text{NH}^+\cdots\text{Cl}^-$. In den Spektren steigt daher mit der Protonierung die Intensität der Absorptionen in dem Wellenzahlbereich $2800 - 2600\text{ cm}^{-1}$ an, der Schwerpunkt dagegen bleibt weitgehend unverändert.

Bei Protonierung des Histidinrestes mit den Carbonsäuren statt mit HCl beobachtet man eine Verlagerung der Intensität vom Bereich um 2800 cm^{-1} zu kleineren Wellenzahlen. Die Absorption bei dem in diesen Spektren um 2630 cm^{-1} auftretenden Submaximum zeigt mit abnehmender Säurestärke immer höhere Absorptionswerte, die im Spektrum mit Monochloressigsäure mit denen beim Maximum um 2850 cm^{-1} vergleichbar werden. Im Gegensatz zum PLH und zum Hydrochlorid tritt außerdem eine breite Bande um 1950 cm^{-1} auf, die mit abnehmender Säurestärke kräftiger wird. Das Erscheinen dieser Bande entspricht den Verhältnissen in den Modellsystemen. Diese Beobachtungen zeigen die Anwesenheit von kräftigen $\text{NH}^+\cdots\text{O}^-$ -Brücken, deren Stärke mit fallendem ΔpK_a bis zum Monochlor-essigsäure-Assoziat zunimmt.

Wird bei Anlagerung der Säure an das PLH keine Protonierung beobachtet, wie im Fall PLH - Ameisensäure und PLH - Essigsäure, dann fehlen im Gegensatz zu den monomeren Modellsystemen ohne Protontransfer kräftige Banden um 2550 und 1950 cm^{-1} . Es tritt hier also keine Fermiresonanz auf.

Diese Absorptionen in den PLH - Säure-Assoziaten sind in Tab. 36 zusammengefaßt.

PLH - HCL	2850-2750 s	2000 vw
PLH - Trifluoressigsäure	2850-2700 s	1960 w
PLH - Trichloressigsäure	2850-2700 s	1950 w
PLH - Dichloressigsäure	2850-2650 s	1960 m
PLH - Monochloressigsäure	2850-2650 s	1960 m
PLH - Ameisensäure	2850-2700 s	-
PLH - Essigsäure	2850-2700 s	-

Tab. 36: Banden der PLH- $\uparrow$ Saure-Assoziats im Bereich
2900 - 1700 cm^{-1}

Für die Betrachtung der kontinuierlichen Absorption gilt bezüglich der Streueffekte das bei PLG (10.5.) Gesagte. Mit diesen Vorbehalten läßt sich feststellen, daß mit fallendem ΔpK_a in den Assoziaten mit Protontransfer eine Anhebung des Spektrenuntergrundes erfolgt. Dagegen tritt in den Systemen ohne Protontransfer anscheinend keine oder nur sehr wenig kontinuierliche Absorption auf. In diesen Systemen steigt die Untergrundabsorption aber bei Hydratation der Filme stark an (14.1.3., 14.2.).

14. Abhängigkeit des Protontransfers von der Hydratation in den PLH - Carbonsäure-Systemen

Die Abhängigkeit des Protontransfers von der Hydratation habe ich wie bei den PLG - Base-Assoziaten untersucht. Ich bespreche zunächst das System, an dem ich die Hydratation am meisten variiert habe, das ist PLH - Essigsäure. In diesem System tritt eine besonders große Zunahme des Protontransfers mit der Hydratation auf.

14.1. PLH - Essigsäure + n H₂O

In Abb. 46 sind die Spektren der hydratisierten Filme und der mit 8, 16 und 30 H₂O gemischten Systeme dargestellt.

Der hydratisierte Film ist bei einem fast gesättigten Dampfdruck über einer Essigsäure - Wasser-Mischung im Volumenverhältnis 1:1 aufgenommen. Die Beladung beträgt etwa 1,0 Moleküle Essigsäure und 1,8 Moleküle Wasser pro Peptidrest. Es liegt in Bezug auf Wasser und Essigsäure ein Desorptionsgleichgewicht vor.

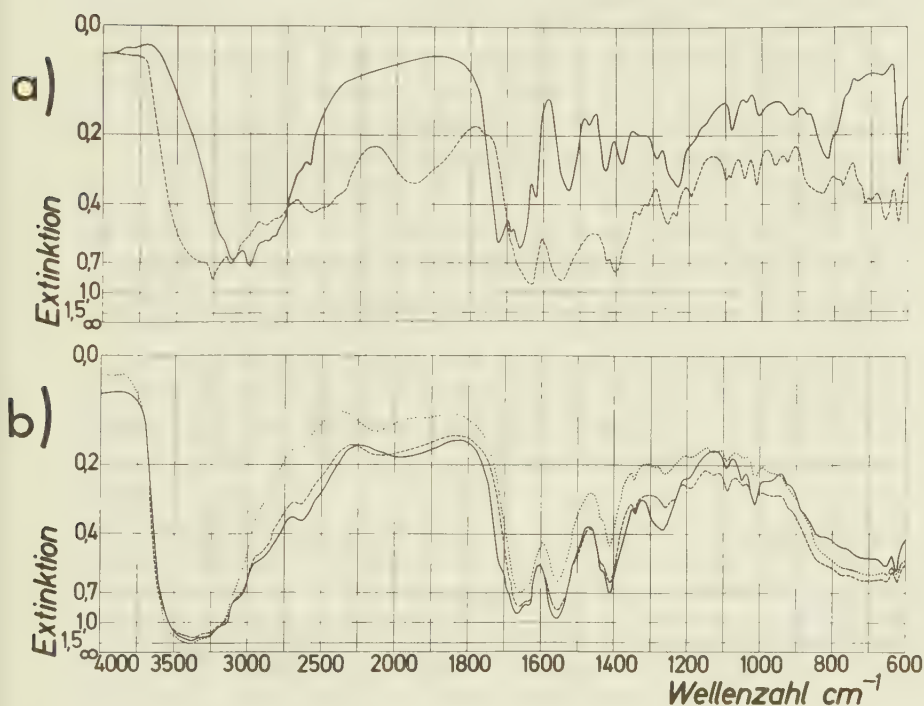


Abb. 46: IR-Spektren von PLH - Essigsäure bei verschiedenen Hydratationsgraden

- a) — trockener Film, --- hydratisierter Film
- b) Mischungen mit n H₂O pro Assoziat:
 — n=8, --- n=16, n=30

14.1.1. COOH- und CO_2^- -Banden und Protontransfer

In den hydratisierten Filmen ist im Gegensatz zum trockenen System die Intensität der COOH- Banden gering. Die $\nu\text{C=O}$ -Bande tritt bei 1715 cm^{-1} nur als schwache Schulter auf, ebenso die δOH bei 1365 cm^{-1} . Die $\nu\text{C-O}$ -Bande liegt um 1260 cm^{-1} , sie ist von CH- Banden überlagert. Dafür sind intensive CO_2^- -Banden zu beobachten, die $\nu_{\text{as}}\text{CO}_2^-$ bei 1555 cm^{-1} und die $\nu_{\text{s}}\text{CO}_2^-$ bei 1410 cm^{-1} (Tab. 37). Beide Banden liegen bei sehr ähnlichen Wellenzahlen wie im System Imidazol - Essigsäure und zeigen damit wieder kraftige Wasserstoffbrücken $\text{NH}^+\cdots\text{O}^-$ an. Die Auswertung der Intensität der $\nu\text{C=O}$ -Bande ergibt, daß 85 % Protontransfer vorliegt. Dies ist eine sehr große Zunahme des Protontransfers bei der relativ geringen Hydratation. Es wird sich zeigen, daß diese Zunahme mit einer Änderung der Sekundärstruktur parallel geht.

In der Mischung mit 8 H_2O sind die CO_2^- -Banden nur wenig intensiver und die COOH- Banden kaum schwächer. Bei Zugabe von 16 und 30 H_2O sind die letzteren Banden verschwunden, d.h. es tritt vollständiger Protontransfer ein. Das Fehlen dieser Banden in der Mischung mit 30 H_2O erkennt man am besten in Abb. 47 im Vergleich mit den stärkeren Säuren. Die Lage der CO_2^- -Banden ist gegenüber der in den hydratisierten Filmen kaum verändert.

Hydratation	$\nu\text{C=O}$	$\nu\text{C-O}$	$\nu_{\text{as}}\text{CO}_2^-$	$\nu_{\text{s}}\text{CO}_2^-$
trocken	1720 vs	1243 s*	-	-
mit 1,8 H_2O	1712 sh,m	1255 m*	1555 s	1410 s
mit 8 H_2O	1715 sh,m	1263 m*	1555 s	1412 s
mit 16 H_2O	1715 sh,vw	n.i. *	1553 vs	1410 s
mit 30 H_2O	-	-	1553 vs	1410 s

* von CH- Banden des Histidinrestes und der Amid III-Bande überlagert

Tab. 37: COOH- und CO_2^- -Banden in dem System PLH - Essigsäure + n H_2O

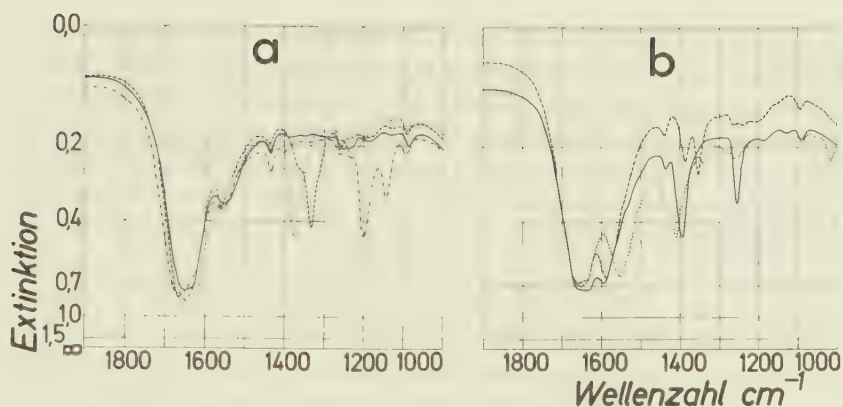


Abb. 47: IR-Spektren: PLH - Säure-Assoziate + 30 H₂O
a) — HCl, --- Trifluoressigsäure, --- Trichloroessigsäure, ... Dichloroessigsäure; b) — Monochloroessigsäure, --- Ameisensäure, ... Essigsäure

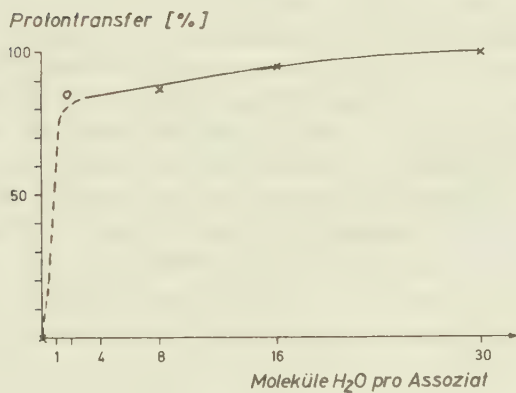


Abb. 48: Protonentransfer bei PLH - Essigsäure in Abhängigkeit von der Wasserzugabe
x=flüssige Mischungen
o=Messung in Desorption bzgl. H₂O

In Abbildung 48 ist der Protontransfer in Abhängigkeit von der Wasserzugabe dargestellt. Als Maß für die Schichtdicke der Proben habe ich die δCH -Bande der Seitenkette bei 1090 cm^{-1} verwendet. Den Teil der Kurve zwischen den ersten beiden Meßpunkten habe ich gestrichelt gezeichnet, da innerhalb dieses Bereichs Messungen unter definierten Bedingungen schwer durchzuführen sind.

14.1.2. Einige Banden des Histidinrestes

Die Ringschwingung des Histidinrestes bei 1620 cm^{-1} , die sich schon ohne Protonierung allein durch die Ausbildung einer kräftigen Wasserstoffbrücke zum N-Atom bildet, ist im hydratisierten Film etwas weniger deutlich als im trockenen als Schulter an der Amid I-Bande zu erkennen. In den Mischungen mit Wasser ist sie neben dieser Amidbande nicht aufgelöst. Von den in Tab. 35 aufgeführten Banden ist die R_2 -Bande um 1475 cm^{-1} weitgehend verdeckt. Die δCH -Bande verschiebt sich von 1083 cm^{-1} im trockenen System nach 1088 cm^{-1} im hydratisierten Film und weiter bis 1092 cm^{-1} in der Mischung mit $30\text{ H}_2\text{O}$. Die Bande um 600 cm^{-1} zeigt nur sehr geringe Verschiebungen. Dagegen sind einige andere Bandenänderungen mit der Protonierung deutlich zu verfolgen. Die in reinem PLH bei 1103 cm^{-1} liegende NH -Bande tritt im hydratisierten Film mit verringerter Intensität auf und verschwindet mit Zugabe von $30\text{ H}_2\text{O}$.* Mit der Wasserzugabe taucht dafür die δNH^+ -Bande bei 1130 cm^{-1} auf, und um 958 cm^{-1} entsteht parallel dazu die γNH^+ -Bande.

* Im trockenen Film wird die Bande nicht bei der erwarteten Lage beobachtet. Vermutlich wird sie von der Konformation beeinflusst.

14.1.3. Absorptionen der Gruppen in den Wasserstoffbrücken

In dem hydratisierten Film sind kräftige breite Banden bei 2500 cm^{-1} und 1960 cm^{-1} zu beobachten, die von den Schwingungen in den fast symmetrischen $\text{NH}^+\cdots\text{O}^-$ -Brücken herrühren. Diese Banden sind in den Mischungen mit Wasser als breite Schultern zu erkennen, sie verlieren mit zunehmender Hydratation an Intensität. Die Absorptionsstruktur ist damit der in den Modellsystemen sehr ähnlich. Die beiden Banden sind vermutlich die von Hadži (51) als B und C bezeichneten Banden, eine möglicherweise vorhandene schwache A-Bande ist verdeckt. Wie schon erwähnt, tritt bei der Hydratation des Films im Gegensatz zum trockenen System eine kräftige kontinuierliche Absorption im gesamten Spektralbereich auf. Diese $\text{NH}^+\cdots\text{O}^-$ -Brücken sind also leicht polarisierbar. Wenn die Hydratation weiter zunimmt, d.h. in den Mischungen mit 8 und mehr H_2O , sinkt die Anhebung des Untergrunds wieder etwas ab.

14.1.4. Banden des angelagerten Wassers

Das System PLH - Essigsäure ist weniger hygroskopisch als das Hydrochlorid. Das entspricht den Verhältnissen bei PLG - Imidazol im Vergleich zum Na-Salz. Die OH-Valenzschwingung des angelagerten Wassers finde ich bei etwas kleineren Wellenzahlen als in dem PLG - Imidazol-Assoziat, nämlich um 3385 cm^{-1} . Hiernach ist das Wasser kräftiger gebunden, d.h. die polaren Gruppen sind in den PLH-Systemen besser zugänglich. Die Scherenschwingung und die gehinderte Torsionsschwingung des Wassers liegen um 1650 bzw. 700 cm^{-1} , die erstere ist von der Amid I-Bande überlagert.

14.2. PLH - Ameisensäure + n H_2O

Ich habe bei diesen wie bei den später diskutierten Systemen einen hydratisierten Film und eine Mischung mit $30\text{ H}_2\text{O}$ untersucht (Abb. 49a).

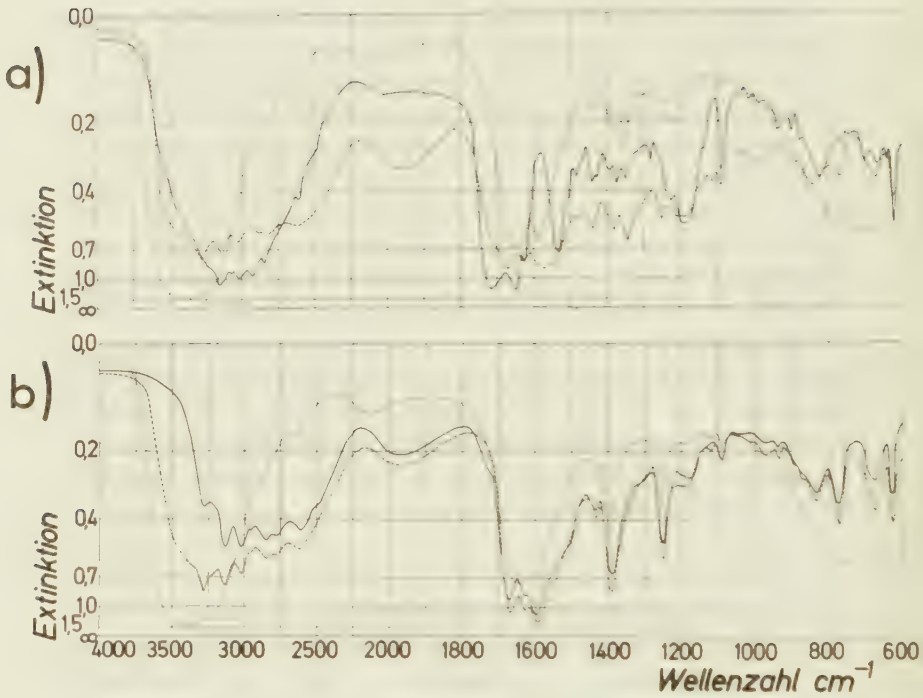


Abb. 49: IR-Spektren von PLH - Carbonsäure-Assoziaten
— trockener Film, --- hydratisierter Film,
... Mischung mit 30 H_2O
a) PLH - Ameisensäure
b) PLH - Monochloressigsäure

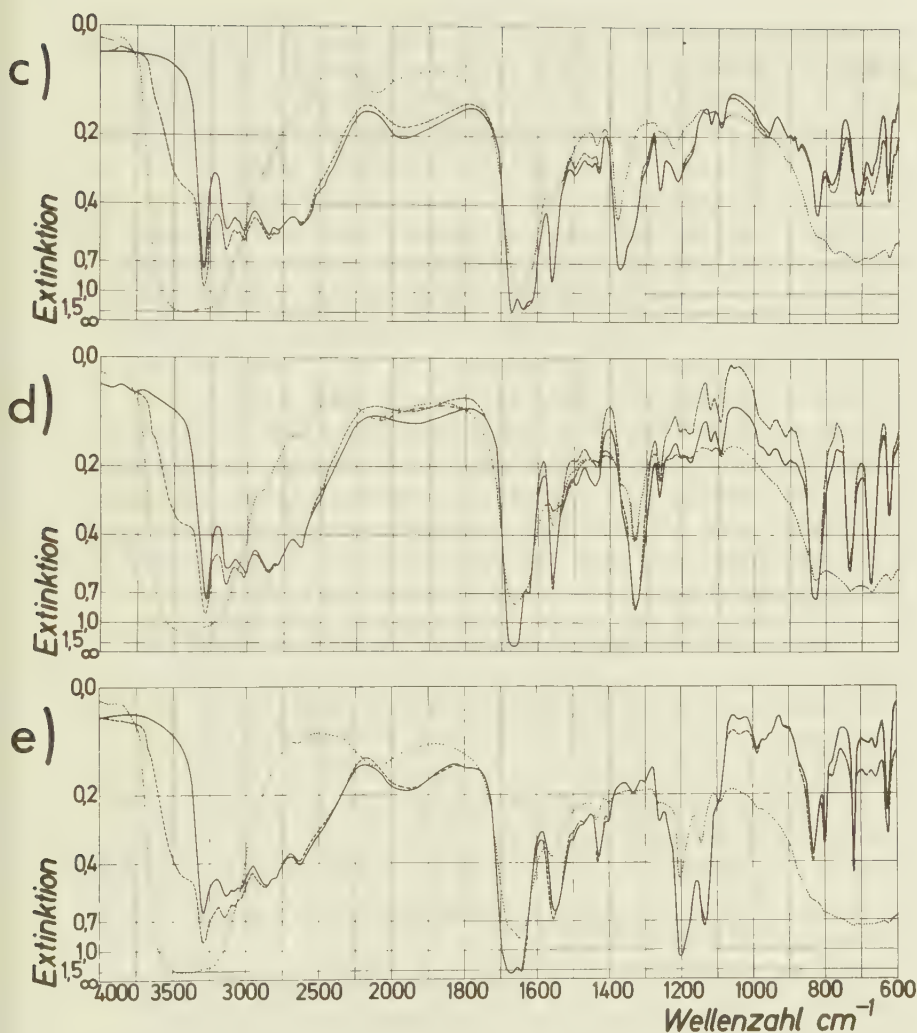


Abb. 49: IR-Spektren von PLH - Carbonsäure-Assoziaten
 — trockener Film, --- hydratisierter Film,
 Mischung mit 30 H_2O
 c) PLH - Dichloressigsäure
 d) PLH - Trichloressigsäure
 e) PLH - Trifluoressigsäure

Der hydratisierte Film ist bei fast gesättigtem Dampfdruck über einer Ameisensäure-Wasser-Mischung im Volumenverhältnis 1:4 hergestellt und bei etwas niedrigerem Dampfdruck (Mischung 22 °C, Film 25 °C) gemessen. Es liegt also Desorption bezüglich der Ameisensäure und des Wassers von einer etwas höheren Beladung aus vor, der Film enthält 1,3 Moleküle Ameisensäure und 2,1 Moleküle H₂O pro Peptidrest.

In dem hydratisierten Film beobachte ich wie bei der Essigsäure und im Gegensatz zu den wasserfreien Systemen nur Reste der $\nu\text{C=O}$ -Bande bei 1723 cm⁻¹ und der $\nu\text{C-O}$ -Bande um 1215 cm⁻¹. Sehr kräftig sind dagegen die $\nu_{\text{as}}\text{CO}_2^-$ -Bande um 1582 cm⁻¹, die $\nu_{\text{s}}\text{CO}_2^-$ -Bande bei 1352 cm⁻¹ und die δOH -Bande des Ameisensäure-Anions bei 1385 cm⁻¹. Nach der Intensität der Carboxylbanden liegt 80 % Protontransfer vor, im Gegensatz zu 15 % im trockenen System. Damit wird wie bei der Essigsäure durch relativ geringe Hydratation eine sehr große Zunahme des Protontransfers erreicht. In der Mischung mit 30 H₂O sind nur die drei erwähnten Banden des Anions vertreten bei 1585, 1373 und 1352 cm⁻¹, es liegt also 100 % Protontransfer vor.

Mit dem Protontransfer im hydratisierten Film entstehen um 2500 und 1950 cm⁻¹ kräftige breite Absorptionsbanden, außerdem tritt im gesamten Spektralbereich eine kontinuierliche Absorption auf. In der Mischung mit 30 H₂O hat die Intensität dieser Banden und des Kontinuums wieder beträchtlich abgenommen. Diese Beobachtungen entsprechen denen im System PLH - Essigsäure + n H₂O.

14.3. Die anderen Systeme

In dem Assoziat PLH - Monochloressigsäure (Abb. 49 b) nimmt bei der Hydratation mit 2 H₂O die Intensität der $\nu\text{C=O}$ -Bande (um 1710 cm⁻¹ als Schulter auftretend) ab, und entsprechend nimmt die der CO_2^- -Banden zu. Dabei steigt der Protontransfer von 93 % auf 95 %. Die CO_2^- -Banden verschieben sich nur wenig, die $\nu_{\text{as}}\text{CO}_2^-$ von 1598 nach 1594 cm⁻¹ und die $\nu_{\text{s}}\text{CO}_2^-$ von 1392 nach 1394 cm⁻¹. Bei Zugabe von 30 H₂O sind nur noch diese Banden zu beobachten, bei dieser Hydratation wird also 100 % Protontransfer erreicht.

In den Systemen PLH-Dichloressigsäure, PLH-Trichloressigsäure und PLH-Trifluoressigsäure (Abb.49 c)-e)) liegt schon in den scharf getrockneten Filmen 100 % Protontransfer vor. Mit der Hydratation der Filme beobachtet man nur sehr kleine Verschiebungen der CO_2^- -Banden, allerdings ist die Hydratation bei der gleichen relativen Luftfeuchtigkeit auch wesentlich geringer als bei den schwächeren Säuren. In den Mischungen mit 30 H_2O zeigen dann die Banden der CO_2^- -Gruppe durch Verschiebung ihres Schwerpunkts zu höheren Wellenzahlen die Schwächung der $\text{NH}^+\cdots\text{O}^-$ -Brücken an und durch das Zusammenwandern die Symmetrisierung der CO_2^- -Gruppe (Tab.38).

	$\nu_{\text{as}}\text{CO}_2^-$	$\nu_{\text{s}}\text{CO}_2^-$
PLH-Monochloressigsäure	1594 (-4)	1396 (+4)
PLH-Dichloressigsäure	1636 (-4)	1379 (+9)
PLH-Trichloressigsäure *	1660 **	1334 (+5)
PLH-Trifluoressigsäure	1672 (-3)	1435 (+5)

* 60° C

** von der Amid I-Bande überlagert

Tab. 38: CO_2^- -Banden in den PLH-Carbonsäure-Systemen mit 30 H_2O und Verschiebung gegenüber den scharf getrockneten Filmen

Die Absorption im Bereich $2900\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ ändert sich mit der Hydratation der Filme kaum. In den Mischungen mit 30 H_2O sind die breiten Banden zu größeren Wellenzahlen verschoben, d.h. die Intensität unterhalb von 2700 cm^{-1} nimmt ab.

14.4. Assoziante mit schwerflüchtigen Carbonsäuren

Um den Schwierigkeiten mit der leichten Flüchtigkeit der Säuren aus dem Wege zu gehen, habe ich auch von Assoziaten von PLH mit anderen Säuren IR-Spektren aufgenommen. Es ergab sich dabei in den scharf getrockneten Filmen von PLH - Glycolsäure 100 % Protontransfer, PLH - β -Chlorpropionsäure 80 % Protontransfer und von PLH - β -Brompropionsäure 50 % Protontransfer. Die pK_a -Werte der Säuren sind 3,83,

3,98 und 4,01. * Die letzten beiden Assoziat zeigen eine reversible Erhöhung des Protontransfers mit der Hydratation, der Effekt ist aber bei 90 % rel. Luftfeuchtigkeit nur gering, da die Filme dabei sehr wenig Wasser adsorbieren.

Die Amidbanden in diesen Spektren sind ähnlich denen bei PLH - Monochloressigsäure; es tritt keine kräftige scharfe Amid A-Bande auf, und die Amid 1-Bande liegt um 1650 cm^{-1} . (vgl. 14.5.3.)

Leider zeigten die letzten beiden Säuren trotz ihres relativ niedrigen Dampfdruckes die Neigung, aus dem Film zu entweichen. Dabei entweicht zunächst der Teil der Säure, von dem das Proton nicht übergetreten ist. Das Protontransfer-Gleichgewicht stellt sich in trockenen Filmen stark verzögert ein (14.7.) mit der Folge, daß ein zu hoher Anteil Protontransfer gemessen wird. Bei genauen Messungen hätte sich also auch bei diesen Substanzen die Notwendigkeit der Nachbedampfung mit den mehrfach geschilderten Komplikationen ergeben. Das System PLH - Glycolsäure dagegen kann wegen der zweiten OH-Gruppe in der Säure nicht ohne weiteres mit den anderen Carbonsäuren verglichen werden.

14.5. Amidbanden und Sekundärstruktur

In den PLH - Säure-Assoziaten ändern sich die Amidbanden und die Sekundärstruktur mit der Hydratation in unterschiedlichem Ausmaß. In den Systemen, bei denen die Änderung des Protontransfers mit der Hydratation am größten ist - bei PLH - Essigsäure und PLH - Ameisensäure - , treten auch die größten Änderungen der Konformation auf.

14.5.1. PLH - Essigsäure + n H₂O

Im Gegensatz zu den Verhältnissen im wasserfreien PLH - Essigsäure-Film - die Amid A-Bande ist dort verbreitert und zu kleinen Wellenzahlen verschoben - beobachtet man in den hydratisierten Filmen die Amid A um 3270 cm^{-1} als scharfe Bande. Daran liegt eine weitgehend geordnete Struktur vor mit kräftigen Wasserstoffbrücken zwischen den

* pK_a -Werte aus (27) und (102)

Peptidgruppen. Die Amid I-Bande ist im hydratisierten Film und in den Mischungen mit 8 und 16 H₂O wie im trockenen System in eine Bande bei 1630 cm⁻¹ und eine um 1665 cm⁻¹ aufgespalten. Bei Aufbewahrung der Proben bei Zimmertemperatur über einige Tage verlagert sich die Intensität mehr zu der Bande bei 1630 cm⁻¹, dies geschieht auch bei der länger dauernden Gleichgewichtseinstellung im hydratisierten Film. Die Amid II-Bande ist wegen der kräftigen ν_{as}CO₂⁻-Bande um 1555 cm⁻¹ schwer zu beobachten. Im hydratisierten Film liegt sie - als Schulter zu erkennen - bei 1530 cm⁻¹, in den Mischungen mit Wasser um 1540 cm⁻¹. Aus diesen Bandenlagen, die in Tab. 39 zusammengefaßt sind, kann auf Anteile von antiparalleler β-Struktur geschlossen werden, die mit dem Alter der Proben zunehmen. Eine dabei erwartete Schulter um 1690 cm⁻¹ ist im hydratisierten Film deutlich zu erkennen.

	Amid A	Amid I	Amid II	Sekundärstruktur
<u>Filme</u>				
trocken	3250 vbr	1690 sh 1667 vs	1550 sh,w 1530 s	Knäuel 2
mit 1,8 H ₂ O hydratisiert	3270 s	1690 sh 1665 sh 1632 vs	verdeckt 1535 sh	β-Struktur
<u>Mischungen mit H₂O</u>				
mit 8 H ₂ O	3270 sh,br	1665 s 1632 s	verdeckt 1538 sh	β-Struktur-Anteile
mit 16 H ₂ O	3270 sh,br	1665 vs 1632 sh	verdeckt 1540 sh	
mit 30 H ₂ O	3270 sh,br	1632 sh 1662 s	verdeckt 1540 sh	

Tab. 39: Amidbanden und Sekundärstruktur in den Systemen PLH - Essigsäure + n H₂O

Beim Übergang vom wasserfreien zum hydratisierten System findet also parallel zum Protontransfer auch eine weitgehende Umordnung der Sekundärstruktur vom Knäuel zur antiparallelen α -Struktur statt, dies wird offenbar vom Protontransfer induziert. Bei weiterer Hydratation bilden sich größere Anteile einer anderen Struktur, nach der Amid I-Bande kann es sich um Knäuel 2 oder Helix 2 handeln.

14.5.2. PLH - Ameisensäure + n H₂O

Wie im Fall der Essigsäure ist bei PLH - Ameisensäure im hydratisierten Film im Gegensatz zum wasserfreien System eine scharfe Amid A-Bande zu erkennen und zwar bei 3295 cm^{-1} . Die Amid I-Bande liegt hier bei 1672 cm^{-1} mit einer schwachen Schulter bei 1650 cm^{-1} und vermutlich einer weiteren schwachen Bande bei 1630 cm^{-1} , die neben der FLH-Bande um 1620 cm^{-1} nicht aufgelöst ist. Die Amid II-Bande liegt bei 1560 cm^{-1} mit einer Schulter bei 1535 cm^{-1} im Gegensatz zum trockenen Film, wo diese Bande das Maximum bei 1530 cm^{-1} zeigt. Im hydratisierten Film liegt danach weitgehend Helix 2 Struktur vor (vermutlich linkshändige α -Helix) nebst geringen Anteilen Knäuel-Struktur. Hier geht also mit dem Protontransfer ebenfalls eine Änderung der Sekundärstruktur vonstatten, in diesem Fall vom Knäuel zur Helix 2 (Tab. 40).

	Amid A	Amid I	Amid II	Sekundärstruktur
trockener Film	3250 vbr	verdeckt 1648 vs	1538 s	Knäuel 1
mit 2,1 H ₂ O hydratisierter Film	3295 s	1672 s 1650 sh,w 1630 w	1560 s 1535 sh	Helix 2
Mischung mit 30 H ₂ O	3270 sh	1665 s 1633 s	1530 sh	

Tab. 40: Amidbanden und Sekundärstruktur in den Systemen
PLH - Ameisensäure + n H₂O

In der Mischung mit 30 H₂O ist die Amid A-Bande um 3270 cm⁻¹ als Schulter zu erkennen. Das Maximum der Amid I-Bande liegt um 1665 cm⁻¹, dabei ist die Schulter um 1633 cm⁻¹ kräftiger geworden. Die Amid II-Bande ist neben der kräftigen ν_{as}CO₂⁻-Bande nur als Schulter um 1530 cm⁻¹ zu erkennen. Diese Banden zeigen, daß sich die Struktur gegenüber der im hydratisierten Film weiter verändert hat, ähnlich wie bei PLH - Essigsäure + 30 H₂O.

14.5.3. Amidbanden und Sekundärstruktur in den anderen Systemen

In den Systemen mit den stärkeren Chlor- und Fluoressigsäuren ändert sich die Sekundärstruktur bei der Hydratation der Filme nicht, ausgenommen bei PLH - Monochloressigsäure. Bei diesem Assoziat bildet sich, wie man insbesondere an dem Entstehen der kräftigen scharfen Amid A-Bande sieht, mit dem vollständigen Protontransfer bei der Hydratation die geordnete Helix 2-Struktur gänzlich aus (Tab. 41). Bei einigen anderen Systemen beobachtet man eine geringe Verschiebung der Amidbanden durch die Hydratation der Filme.

Beim Übergang zu den Mischungen mit 30 H₂O ändern sich dagegen die Amidbanden in fast allen Systemen (Tab. 41), bei PLH - Trichloressigsäure + 30 H₂O allerdings erst bei Erwärmung auf 60°C (bei dieser Temperatur wird die Lösung klar, --- Abb. 49 d). Aus der Aufspaltung der Amid II-Bande bzw. dem Auftreten der Schulter um 1530 cm⁻¹ ist zu schließen, daß bei dieser Hydratation eine Umwandlung in eine - geknäuelte - Struktur beginnt, wie sie in verdünnter Lösung vorliegt. Dies könnte durch die beginnende Dissoziation der Protontransfer-Brücken verursacht sein.

		Amid A	Amid I	Amid II	Sekundärstruktur
PLH - Monochlor- essigsäure	t(a)	3282 m 3250 vbr	1672 vs 1628 m	1560 sh 1530 sh	Helix 2 + Knäuel
	h(b)	3285 s	1672 vs 1629 m	1560 m 1530 sh,w	Helix 2
	30 H ₂ O(c)	3260 sh,br	1662 s 1630 s	verdeckt* 1535 sh	Helix 2 + Knäuel
PLH - Dichlor- essigsäure	t,h	3290 s	1672 vs	1562 s	Helix 2
	30 H ₂ O	3290 sh,br	1670 sh verdeckt	1562 m 1530 sh,m	Helix 2 + Knäuel
PLH - Trichlor- essigsäure	t,h	3290 s 3280 sh	1670 vs*	1559 s	Helix 2
	30 H ₂ O	3270 sh,br	1670 vs*	1559 m 1530 sh,w	Helix 2
	30 H ₂ O, 60°C	3270 sh,br	1670 vs*	1559 w-m 1530 sh,m	Helix 2 + Knäuel
PLH - Trifluor- essigsäure	t,h	3293 s	1674 s* 1647 s	1552 s 1530 sh,w	Helix 2 + Knäuel
	30 H ₂ O	2370 sh,br	1674 s* 1649 m-s 1628 sh	1557 m 1530 sh,w	Helix 2 + Knäuel

- (a) Film, scharf getrocknet
 (b) Film, hydratisiert
 (c) Mischung mit 30 H₂O
 * Bande von $\nu_{as} \text{CO}_2$ überlagert

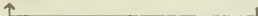
Tab. 41: Amidbanden und Sekundärstruktur in hydratisierten PLH - Säure-Assoziaten

14.6. Hydratation, Protontransfer und Sekundärstruktur

In Abschnitt 13 und 14 habe ich gezeigt, daß in den PLH - Carbonsäure-Systemen alle drei Parameter Hydratation, Protontransfer und Sekundärstruktur miteinander zusammenhängen. Aus den Untersuchungen, insbesondere den mit den Monomeren in Teil A und mit den PLG-Mischungen, geht hervor,

daß die Hydratation den Protontransfer direkt beeinflußt. Die Konformation dagegen wird in den PLH - Carbonsäure-Systemen von der Hydratation nur beeinflußt, wenn gleichzeitig eine Änderung des Protontransfers eintritt. Der Einfluß auf die Konformation ist daher nur mittelbar.

Die Wirkung der Konformation auf den Protontransfer, welcher im nächsten Kapitel an Hand weiterer Experimente noch ausführlicher behandelt wird, ist dagegen als Rückkopplung anzusehen. Damit ergibt sich folgendes Schema:

Hydratation $\rightarrow$ Protontransfer $\rightarrow$ Konformationsumwandlung


Durch die Annahme dieser positiven Rückkopplung lassen sich die im Vergleich zu den anderen Systemen steilen Kurven bei der Abhängigkeit des Protontransfers vom ΔpK_a und von der Hydratation in den PLH - Säure-Assoziaten erklären.

Eine weitere positive Rückkopplung Protontransfer $\rightarrow$ Hydratation ist nach den Untersuchungen der PLG - Base-Assoziate wahrscheinlich (diese werden mit dem Protontransfer hygroskopischer). Der Effekt bleibt bei den vorliegenden PLH - Säure-Systemen aber klein. Wird nämlich bei Assoziaten mit den stärkeren Carbonsäuren oder bei Säureüberschuß eine stabile Helix-Struktur gebildet, bleiben die Systeme auf Grund der Konformation wenig hygroskopisch. Daneben macht sich der hydrophobe Charakter der halogensubstituierten Carbonsäuren bemerkbar.

14.7. PLH-Filme aus Carbonsäureüberschuß, Kopplung von Protontransfer an die Konformationsumwandlung

Wenn man PLH - Carbonsäure-Filme für einige Zeit mit Säureüberschuß behandelt, erhält man von dem Vorigen etwas abweichende Ergebnisse bezüglich Protontransfer und Konformation. Diese lassen weitere Aussagen über die Kopplung der beiden Parameter zu. Die Spektren dazu sind in Abb. 50 dargestellt.

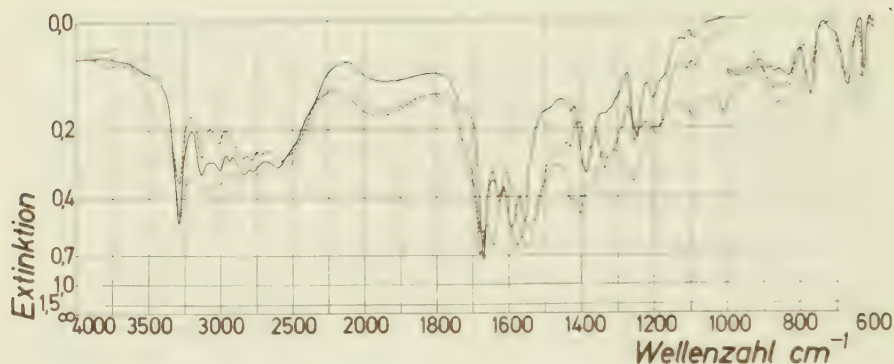


Abb. 50: IR-Spektren von PLH - Carbonsäure-Assoziaten nach Desorption von Carbonsäure-Überschuß: — PLH - Monochloressigsäure, --- PLH - Ameisensäure, PLH - Essigsäure

PLH - Ameisensäure

Wenn man einen völlig wasserfreien PLH-Film mit mehr als zweifachem Überschuß Ameisensäure für einige Stunden belädt, erhält man wie im hydratisierten System ohne Säureüberschuß 100 % Protontransfer und auch ähnliche Amidbanden (Tab. 42). Der Säureüberschuß hat also bezüglich Struktur und Protontransfer dieselben Folgen wie die Hydratation.

	Proton-transfer	Amid A	Amid I	Amid II	Sekundärstruktur
nach Säureüberschuß, wasserfrei	100 %	3290 s	1679 vs 1630 m	verdeckt 1535 sh,m	Helix 2
hydratisiert mit 2,1 H ₂ O	93 %	3290 s	1662 vs 1650 sh,w 1630 m	verdeckt 1535 sh,m	Helix 2
wasserfrei	15 %	3250 vbr	1690 sh 1667 vs	1550 sh 1530 s	Knäuel 2

Tab. 42: Protontransfer und Sekundärstruktur in PLH - Ameisensäure-Filmen bei Anwesenheit von 1 Molekül Ameisensäure pro Histidinrest

In dem System mit Bedampfung mit Säureüberschuß liegt der Hauptanteil der Amid I-Bande bei 1679 cm^{-1} . Die scharfe Amid A-Bande bei 3290 cm^{-1} zeigt, daß diese Lage nicht durch schwächere Wasserstoffbrücken zwischen den Peptidgruppen, sondern durch die Sekundärstruktur bedingt ist. Vermutlich liegt eine Helix 2-Struktur vor wie bei den Assoziaten mit den stärkeren halogensubstituierten Essigsäuren.

Der Unterschied zu den Assoziaten ohne Säureüberschuß zeigt sich bei Desorption des Ameisensäure-Überschusses. Die Helix-Struktur ist nun so vollständig ausgebildet, daß sie für einige Zeit stabil bleibt, auch im wasserfreien Zustand. Die Carboxylbanden zeigen, daß in diesen Filmen weiterhin 100 % Protontransfer vorliegt. In Tab. 42 ist das mit den bisherigen Ergebnissen verglichen. In trockenen Filmen kann man also bei Anwesenheit von 1 Molekül Ameisensäure pro Histidinrest sehr wenig oder vollständigen Protontransfer beobachten, je nachdem, ob Adsorption*(13.2.) oder Desorption (s.o.) bezüglich der Säure vorliegt; in Abhängigkeit von der Säuresorption zeigt der Protontransfer also eine Hystereserscheinung. Dies ist in Abb. 51 dargestellt. Dabei sind die Konformationsänderungen an Hand der Amid I-Bande gegenübergestellt (Der Bereich geringer Beladung mit Ameisensäure war am Ende von 13.1. diskutiert).

Das Ergebnis, daß nach Desorption des Ameisensäure-Überschusses die restliche Säure besonders fest gebunden ist, zeigt auch die Sorptionskurve in Abb. 31 (8.5.). Eine geringe Hydratation der Filme führt dagegen zum schnellen Entweichen der Ameisensäure.

In wasserfreien Filmen ist eine Konformationsumwandlung häufig nicht möglich. Das zeigen auch die Beobachtungen an den PLG - Base-Filmen in dieser Arbeit und die Ergebnisse anderer Autoren (104, 20). Dies legt nahe, daß für die Hystereseerscheinungen eine erschwerte Konformations-

* genauer: Desorption von kurzzeitigem sehr geringem Überschuß

umwandlung verantwortlich ist und daß der Protontransfer an diese Umwandlung gekoppelt ist. Danach erfolgt das Proton an der Säure oder an der Base lokalisiert, je nach der Konformation.

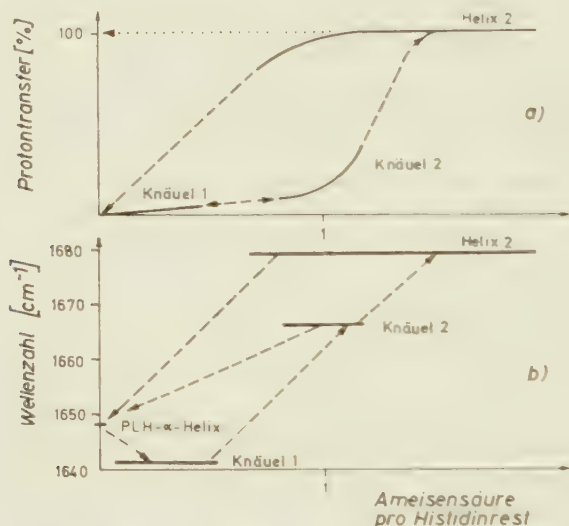


Abb. 51: Protontransfer und Amid I-Bande in FLH - Ameisensäure-Filmen in Abhängigkeit von der Säurebeladung
a) Protontransfer: — und --- protonierte Histidinreste (%), ...deprotonierte Säure (%); — Bereiche definierter Struktur, --- stark geschwindigkeitsabhängige Werte
b) Lage des Maximums der Amid I-Bande: — Bereiche definierter Struktur

Gleiches Verhalten wie mit Ameisensäure-Überschuß bedampfte Filme zeigen Filme, die aus einer Mischung von Ameisensäure und Wasser im Volumenverhältnis 1:1 hergestellt sind und über CaCl₂ eingetrocknet sind. Aus diesen entweicht zunächst vor allem das Wasser und es bleiben etwa 1 Molekül Ameisensäure pro Histidinrest fest gebunden. Bei diesen Filmen liegt 100 % Protontransfer vor und gleiche Amidbanden wie oben.

PLH - Monochloressigsäure

Bei diesem System habe ich ebenfalls einen Hysterese-effekt festgestellt, der allerdings wesentlich geringer ist. Ich habe Filme aus wäßriger Lösung mit 2 - 3-fachem Monochloressigsäure-Überschuß eingetrocknet. Aus diesen läßt sich die überschüssige Säure durch Abpumpen leicht entfernen. Die wasserfreien Systeme zeigen danach für einige Tage 100 % Protontransfer, im Gegensatz zu 93 % ohne vorherigen Säure-überschuß. Die Amidbanden liegen wie folgt:

Amid A	Amid I	Amid II	
3292 s	1671 vs	1560 s	* von Bande des Histidin-
	1632 m*	1535 sh,w	restes überlagert

Die Amid I- und II-Banden sind nur wenig verändert und etwas schärfer ausgebildet, die Amid A-Bande tritt nun auch im wasserfreien System kräftig und scharf auf.

Säureüberschuß und Konformation

Neben der Art der angelagerten Monomeren, dem Ausmaß des Protontransfers in den Wasserstoffbrücken und der Hydratation kann auch der Carbonsäureüberschuß als Lösungsmittelanteil die Struktur mitbestimmen. Während halogensubstituierte Essigsäuren meistens helixbrechend wirken (105), ruft Behandlung mit Ameisensäure zum Teil Helix-, zum Teil auch β -Struktur hervor (106). In beiden Fällen sind vermutlich Wechselwirkungen mit dem Polypeptidrückgrat beteiligt (107, 108). Die Feststellung, daß beim Protontransfer durch Hydratation oder durch Säureüberschuß die gleiche Helix-Struktur erreicht wird, spricht dafür, daß der Effekt weitgehend durch den Protontransfer bestimmt wird.

PLH - Essigsäure

In diesem System tritt keine Hystereseerscheinung auf. Ich habe PLH - Essigsäure-Filme aus einer Essigsäure - Wasser-Mischung hergestellt und sofort gemessen und andere PLH-Filme mit Essigsäure-Überschuß bedampft. Bei diesen Proben erhalte ich weitgehenden Protontransfer und ähnliche Amidbanden wie in den mit Essigsäure und Wasser bedampften Filmen (14.5.1.). Auch hier wirkt der Säureüberschuß wie die

Hydratation. Die Helix 2-Struktur, die im Fall der stärkeren Säuren auftritt, wird nur teilweise ausgebildet; die Struktur von Knäuel 1 herrscht vor, wie der Teil der Amid I-Bande bei 1644 cm^{-1} neben dem bei 1670 cm^{-1} zeigt. Nach Desorption des Überschusses - welche sehr rasch erfolgt - geht der Protontransfer sofort zurück, und entsprechend wandert sich die Struktur um.

Zusammenfassung

Es wurden Modellsysteme für die Assoziation von Glutaminsäure- und Histidinresten in Proteinen untersucht; zwischen diesen Seitengruppen kann sich eine weitgehend symmetrische Wasserstoffbrücke bilden. Die Abhängigkeit des Protontransfers in derartigen Wasserstoffbrücken vom ΔpK_a und von der Hydratation wurde an Hand der IR-Banden verfolgt, insbesondere an Hand der Carboxylbanden. Außerdem wird der Zusammenhang zwischen der Symmetrie der Wasserstoffbrücken und dem Auftreten der kontinuierlichen Absorption im IR-Spektrum diskutiert, welche die Polarisierbarkeit der Brücken anzeigt.

Als Modelle dienten drei Gruppen von Systemen:

- a) homogene flüssige Mischungen von Carbonsäuren und N-Basen
- b) Assoziat von PLG und N-Basen
- c) Assoziat von PLH und Carbonsäuren

Bei den Assoziaten mit den Polymeren wird auch die Sekundärstruktur an Hand von Lage und Aufspaltung der Amidbanden betrachtet ebenso wie der Zusammenhang zwischen Sekundärstrukturänderungen, Protontransfer und Hydratation.

Assoziat von monomeren Säuren und Basen

- 1) Mit zunehmendem ΔpK_a tritt das Proton in den untersuchten Assoziaten von der Säure zur Base über. Bei Werten des ΔpK_a zwischen 1,0 und 4,5 tritt teilweiser Protontransfer auf, dabei beobachtet man gleichzeitig die Banden der protonierten und der unprotonierten Form. Diese Banden gehen nicht kontinuierlich ineinander über. Danach kann ein symmetrisches Einfachminimumpotential in den Wasserstoffbrücken ausgeschlossen werden.
- 2) Bei allen Assoziaten treten im Bereich über 1700 cm^{-1} kräftige breite Banden auf, welche die Knüpfung der starken Wasserstoffbrücken zwischen Säure und Base anzeigen. Die Stärke dieser Brücken wird an Hand der Lage der COOH- bzw. CO_2^- -Banden diskutiert.

- 3) 50 % Protontransfer tritt in den wasserfreien Systemen auf, wenn die Säure um ΔpK_a 2,6 saurer ist als die Base; dabei handelt es sich um Basen, die eine zweite wasserstoffbrückenbildende Gruppe der Form $-NH$ besitzen. Ist keine zweite Gruppe anwesend, beträgt der ΔpK_a für 50 % Protontransfer etwa 4,0. Dieses Ergebnis wird mit Befunden verglichen, die andere Autoren auch mit anderen Methoden erhalten haben. Es besteht gute Übereinstimmung.
- 4) Die Anlagerung von Wassermolekülen an die Assoziat begünstigt den Protontransfer zur Base. Nach Hydratation mit 4 Molekülen H_2O pro Assoziat tritt 50 % Protontransfer bereits bei einem ΔpK_a von 0,9 ein. Bei weiterer Zugabe von Wasser nimmt der Protontransfer weiter zu, bezogen auf die gleiche Menge Wasser aber immer langsamer.
- 5) Die kontinuierliche Absorption wird quantitativ ausgewertet, und ihre Abhängigkeit vom ΔpK_a wird mit der des Protontransfers verglichen. In allen Systemen, in denen das Proton nicht vollständig an der Säure oder an der Base lokalisiert ist, tritt die kontinuierliche Absorption im Grundschriftungsbereich auf. In diesen Fällen - also nicht nur in den vollständig symmetrischen Systemen - ist die Wasserstoffbrücke leicht polarisierbar.
- 6) Der Zusammenhang zwischen Protontransfer und kontinuierlicher Absorption in Abhängigkeit von der Hydratation wird diskutiert. Die Intensität des Kontinuums nimmt zu, wenn die Hydratation die Symmetrie der Brücken erhöht, und entsprechend ab, wenn sie diese erniedrigt. Eine vorzeitige Abnahme der Kontinuumssextinktion zeigt ein Aufbrechen der $NH^+ \cdots O^-$ -Brücken, d.h. die Dissoziation der Protontransferkomplexe an. Diese beginnt bei weitgehend symmetrischen Brücken erst bei Zugabe von mehr als 4 Molekülen H_2O pro Assoziat und nimmt bei weiterer Wasserzugabe nur langsam zu.

PLG - Carbonsäure- und PLH - N-Base-Assoziat

- 7) Die Veränderungen an den IR-Banden der sauren und basischen Gruppen in den Assoziaten mit PLG und PLH entsprechen im wesentlichen denen bei den Monomeren. Darüber hinaus zeigen manche dieser Banden eine Abhängigkeit von der Sekundärstruktur.
- 8) 50 % Protontransfer tritt bei ähnlichen ΔpK_a -Werten auf wie bei den Monomeren, nämlich bei 2,3 für PLG - N-Base und bei 2,8 für PLH - Carbonsäure-Systeme. Danach sind die Wasserstoffbrücken zwischen Histidin- und Carboxylresten in Proteinen ebenfalls weitgehend symmetrisch. Die Vergleichbarkeit der pK_a -Werte der Polymeren und Monomeren wird kurz diskutiert; für die Polymeren sind die pK_o -Werte eingesetzt.
- 9) Die Hydratation fördert den Protontransfer in fast gleichem Ausmaß wie im Fall der Monomeren; dabei ist beachtet, daß auch die Peptidgruppen hydratisiert werden.

Bei den PLG - Base-Assoziaten erhält man in Abhängigkeit von der Hydratation eine reversible Änderung des Protontransfers. Bei den PLH - Säure-Assoziaten ist der Protontransfer eng an eine Konformationsumwandlung gekoppelt. Dies führt zu einer besonders empfindlichen Abhängigkeit des Protontransfers vom ΔpK_a und von der Hydratation und zu einer Verknüpfung aller drei Parameter Hydratation, Protontransfer und Konformation.
- 10) In PLG - n-Propylamin-Filmen findet man eine reversible hydrationsabhängige Konformationsumwandlung α -Helix $\rightleftharpoons$ antiparallele β -Struktur, ähnlich wie bei den Alkalisalzen der PLG. Die anderen PLG - Base-Assoziat zeigen diesen Effekt nicht, sie liegen als α -Helix vor.

In den PLH - Carbonsäure-Assoziaten liegt, wenn weitgehender Protontransfer eingetreten ist, vermutlich eine linkshändige α -Helix vor. Im Fall der schwächeren Säuren treten in einigen Fällen "Knäuel"-Strukturen auf, die

sich den genannten Konformationen nicht zu rücken lassen. Bei Adsorption von Essigsäure ohne Auftreten von Protontransfer bleibt die α -Helix wie bei PLH erhalten, auf die Adsorption von Ameisensäure dagegen reagiert die Sekundärstruktur sehr empfindlich.

In PLH-HCl-Filmen wird zwischen 90% und 98% rel. Luftfeuchtigkeit eine reversible Konformationsumwandlung zwischen zwei "Knäuel"-Strukturen gefunden.

Bei Hydratation mit 30 H₂O treten in vielen Systemen Änderungen der Sekundärstruktur auf.

- 11) In trockenen Filmen sind Konformationsumwandlungen sehr erschwert. Durch die Kopplung des Protontransfers an diese Umwandlungen ergeben sich bei PLH - Säure-Assoziaten Hysterese-Erscheinungen bei der Abhängigkeit des Protontransfers von der Säurebeladung. Diese sind im System PLH - Ameisensäure am stärksten ausgeprägt.

Die Verzögerung der Konformationsumwandlung beeinflusst auch die Abhängigkeit des Protontransfers von ΔpK_a und verschiebt dabei den ΔpK_a bei 50 % Protontransfer zu höheren Werten.

Literatur

- (1) M.F.Perutz: Nature 228, 734 (1970)
- (2) D.M. Blow, J.J.Birktoft und B.S.Hartley: Nature 221, 337 (1969)
- (2a) J.J.Birktoft und D.M.Blow: J.Mol.Biol. 68, 187 (1972)
- (2b) R.M.Stroud, L.M.Kay und R.E.Dickerson: Symp.Quant.Biol. 36, 125 (1971)
- (2c) D.M.Shotton und H.C.Watson: Nature 225, 811 (1970)
- (2d) J.Kraut in: "The Enzymes", P.D.Boyer ed., 3rd edn. Vol.3, Academic Press, New York 1971
- (3) H.Rüterjans, H.Witzel und O.Pongs: Biochem.Biophys. Res.Comm. 37, 247 (1969)
- (3a) H.Rüterjans und O.Pongs: Europ.J.Biochem. 18, 313 (1971)
- (3b) H.Rüterjans : Habilitationszeitschrift Universität Münster/Westf. FRG 1971
- (4) R.A.Hudson, R.M.Scott und S.N.Vinogradov: Biochim. Biophys.Acta 181, 353 (1969)
- (5) P.B.Sigler, D.M.Blow, B.W.Matthews und R.Henderson: J.Mol.Biol. 35, 143 (1968)
- (6) R.Lindemann und G.Zundel: JCS Faraday II 68, 979 (1972)
- (7) G.M.Barrow: J.Am.Chem.Soc. 78, 5802 (1956)
- (8) Th.Zeegers-Huyskens: Spektrochim.Acta 21, 221 (1965)
- (9) S.L.Johnson und K.A.Rumon: J.Phys.Chem. 69, 74 (1965)
- (10) H.Ratajczak und L.Sobczyk: J.Chem.Phys. 50, 556 (1969)
- (11) L.Sobczyk und Z.Pawełka: Roczniki Chem. 47, 1523 (1973)
- (11a) L.Sobczyk und Z.Pawełka: JCS Faraday I 70, 832 (1974)
- (12) G.Debecker und P.Huyskens: J.chim.phys. 68, 295 (1971)
- (13) D.F.De Tar und R.W.Novak: J.Am.Chem.Soc. 92, 1361 (1970)
- (14) H.Chihara und N.Nakamura: Bull.Chem.Soc.Japan 7, 1980 (1971)
- (15) J.Nasielski und E.V.Donckt: Spectrochim.Acta 19, 1989 (1963)
- (16) F.E.Critchfield, J.A.Gibson Jr. und J.L.Hall: J.Am.Chem.Soc. 75, 1991 (1953)
- (17) G.M.Barrow und E.Anne Yerger: J.Am.Chem.Soc. 77, 4474 (1955)

- (18) G.V.Gusakova, G.S.Denisov und A.L.Smolyanskii:
Zh.Prikl.Spektr. 14, 860 (1971)
- (19) Z.Dega-Szafran, E.Grech, M.Z.Naskret-Barciszewska und
M.Szafran: JCS Perkin II 1975, 251
- H.Lenormant, A.Boudras und E.R.Blout: J.Am.Chem.Soc.
80, 6191 (1958)
- (20) P.Doty, A.Wada, J.T.Yang und E.R.Blout: J.Pol.Science
43, 851 (1957)
- (21) L.Goldstein und E.Katchalski: Bull.Res.Counc.of Israel
9A, 138 (1960)
- (22) E.Iizuka und J.T.Yang: Biochemistry 4, 1249 (1965)
- (23) W.Sessler: Diplomarbeit Universität München 1969
- (24) M.L.Tiffany und S.Krimm: Biopolymers 8, 347 (1969)
- (25) M.L.Tiffany und S.Krimm: Biopolymers 6, 1379 (1968)
- (26) Handbook of Chemistry and Physics, Ed.C.D.Hodgman,
49th edn.,The Chemical Rubber Co.,Cleveland,Ohio,1969
- (27) D.D.Perrin: "Dissociation Constants of Organic Bases in
Aqueous Solution", Butterworth, London 1965
- (28) R.Herbeck: Dissertation,Universität München 1974
- (29) K.P.Hofmann: Dissertation,Universität München 1972
- (30) D.Schjöberg: Dissertation,Universität München 1975
- (31) L.J.Bellamy: "Infrared Spectra of Complex Molecules"
Methuen, London 1958
- (32) F.F.Bentley, L.D.Smithson und A.L.Rozek: "Infrared
Spectra and Characteristic Frequencies 700-300 cm^{-1} "
Interscience Publishers, New York 1968
- (33) J.K.Wilmshurst: J.Chem.Phys. 25, 478 (1956)
- (34) M.Hauric und A.Novak: J.Chim.Phys. 62, 137 (1965)
- (35) C.V.Berney, R.L.Redington und K.C.Lin: J.Chem.Phys.
53, 1713 (1970)
- (36) R.Lindemann: Diplomarbeit,Universität München 1970
- (37) D.Hadži und N.Sheppard: Proc.Roy.Soc. 216, 247 (1953)
- (38) E.Spinner: J.Chem.Soc.(B) 1967, 879
- (39) E.Spinner: J.Chem.Soc.(B) 1964, 4217
- (40) D.Hadži und A.Novak: "Infrared Spectra of, and Hydrogen
Bonding in, Some Acid Salts of Carboxylic Acids"
Universität Ljubljana 1960

- (41) G.V.Gusakova und G.S.Denisov: I.Opt.i.Spektr. 32, 922 (1972)
- (42) M.Hauric, J.Chim.Phys. 64, 679 (1967)
- (43) G.V.Gusakova und G.S.Denisov: Zh.Prídkl.Spektr. 14, 858 (1971)
- (44) P.Huyskens und Th.Zeegers-Huyskens: J.Chim.Phys.62, 81 (1964)
- (45) J.Jadżyn und J.Mańecki: Acta Phys.Polon. A41, 599 (1972)
- (46) R.Yamdagni und P.Kebarle: J.Am.Chem.Soc. 95, 3504 (1973)
- (47) K.Hiraoka, R.Yamdagni und P.Kebarle: J.Am.Chem.Soc. 95, 6833 (1973)
- (48) Messungen von W.Sessler und von J.Fritsch, Phys.Chem. Institut, München, Labor Prof.Dr.G.Zundel
- (49) C.Brissette und C.Sandorfy: Can.J.Chem. 38, 34 (1959)
- (50) R.D.Waldron: J.Chem.Phys. 21, 734 (1953)
- (51) D.Hadži: Pure Appl.Chem. 11, 435 (1969)
- (52) D.Hadži und S.Bratoz in: " The Hydrogen Bond , Recent Developments in Theorie and Experiment", Ed.P.Schuster, G.Zundel und C.Sandorfy, North Holland Publ.Comp.1976
- (53) G.Zundel: "Hydration and Intermolecular Interaction ", Academic Press, New York 1969 ; Mir, Moskau 1972
- (53a) (53), Kap.V
- (53b) (53), Kap.III,2
- (53c) (53), Kap.VII,2
- (54) D.Hadži und N.Kobilarov: J.Chem.Soc. A 1966, 439
- (55) Takahashi, Mamola und Plyler J.Mol.Spectr. 21, 217 (1966)
- (56) A.N.Siderov: Opt.i.Spektr. 8, 51 (1960)
- (57) G.Zerbi, B.Gawford, J.Overend: J.Chem.Phys. 38, 127 (1963)
- (58) M.Cordes und J.L.Walter: Spectrochim.Acta 24A, 237 (1968)
- (59) J.W.Smith und M.C.Victoria: J.Chem.Soc. A 1968, 2468
- (60) G.M.Barrow und E.A.Yerger: J.Am.Chem.Soc. 76, 5211 (1954)
- (61) E.Grunwald und E.Price: J.Am.Chem.Soc. 86, 2970 (1964)
- (62) Stillinger: J.Phys.Chem. 74, 3677 (1970)
- (63) R.M.Scott und S.N.Vinogradov: J.Phys.Chem. 73, 1890 (1969)

- (64) G.Zundel in " The Hydrogen Bond, Recent Developments in Theory and Experiment", Ed. P. Schuster, G. Zundel und C. Sandorfy, North Holland Publ. Comp. 1976
- (65) M. Szafran und Z. Dega-Szafran: Roczniki Chem. 44, 793 (1970)
- (66) R. Janoschek, E. G. Weidemann, H. Pfeiffer und G. Zundel: J. Am. Chem. Soc. 94, 2387 (1973)
- (67) Z. Pawlak: Roczniki Chem. 47, 641 (1973)
- (68) M. Nagasawa und A. Holtzer: J. Am. Chem. Soc. 86, 548 (1964)
- (69) A. Patchornik, A. Berger und E. Katchalski: J. Am. Chem. Soc. 79, 5227 (1957)
- (70) A. Wada: Mol. Phys. 3, 409 (1960)
- (71) Z. Pawlak und L. Sobczyk in "Adv. Relax. Processes" vol. 6 Elsevier Publ. Amsterdam 1973
- (72) Ullmanns Enzyklopädie der technischen Chemie, Bd. 4, S. 567 Urban und Schwarzenberg, München 1957
- (73) K. P. Hofmann und G. Zundel: Rev. Scientific Instr. 42, 1727 (1971)
- (74) R. H. Stokes und R. A. Robinson: Ind. Eng. Chem. 41, 2013 (1949)
- (75) G. M. Schwab: "Handbuch der Katalyse", Bd. 5 II S. 158 Wien 1940
- (76) S. Ikeda, A. Kito, T. Imae und H. Maeda: J. Colloid Interface Sci. 48, 256 (1974)
- (77) Th. Wieland und G. Schneider: Ann. Chem. Liebigs 580, 159 (1953)
- (78) T. Miyazawa, T. Shimanouchi und S.-J. Mizushima: J. Chem. Phys. 29, 611 (1958)
- (79) E. J. Amrose und A. Elliot: Proc. Roy. Soc. A 105, 47 (1951)
- (80) C. H. Bamford, A. Elliot und W. E. Hanby: "Synthetic Polypeptides", Academic Press, New York 1956
- (81) A. Elliot: Proc. Roy. Soc. A 221, 104 (1954)
- (82) T. Miyazawa: J. Chem. Phys. 32, 1647 (1960)
- (83) T. Miyazawa und E. R. Blout: J. Am. Chem. Soc. 83, 712 (1961)
- (84) J. A. Schellman und C. Schellman in "The Proteins" Bd. 2 Ed. H. Neurath, Academic Press, New York 1964
- (85) F. S. Parker: "Applications of Infrared Spectroscopy in Biochemistry, Biology and Medicine" Kap. 10, Hilger, London 1971

- (86) T.Miyazawa in " Poly- α -Amino-Acids ", Ed.G.D.Fasman, Dekker, New York 1967
- (87) Y.Masuda, K.Fukushima, T.Fujii und T.Miyazawa: Biopolymers 8, 91 (1969)
- (88) M.Tsuboi: J.Polymer Sci. 59, 139 (1962)
- (89) S.Suzuki, Y.Iwashita, T.Shimanouchi und M.Tsuboi Biopolymers 4, 337 (1966)
- (90) J.Mühlinghaus und G.Zundel: Biopolymers 10, 711 (1971)
- (90a) J.Mühlinghaus: Dissertation, Universität München 1971
- (91) S.W.Englander in: " Poly- α -Amino-Acids ", Ed. G.D. Fasman, Dekker, New York 1967
- (92) Y.N.Chirgadze und Braznikov , Biopolymers 13, (1974)
- (92a) Y.N.Chirgadze, B.V.Shestopalov und S.Y.Venyaminov: Biopolymers 12, 1337 (1973)
- (93) M.Atreyi und R.C.Gupta: Bull.Chem.Soc.Japan 46, 2795 (1973)
- (94) J.L.Koenig und B.Frushour: Biopolymers 11, 1871 (1972)
- (95) M.Laskowsky und H.A.Scheraga: J.Am.Chem.Soc. 76, 6305 (1954)
- (96) K.S.Norland, G.D.Fasman, E.Katchalski und E.R.Blout: Biopolymers 1, 277 (1963)
- (97) S.Beychok, M.N.Pflumm und J.E.Lehmann: J.Am.Chem.Soc. 87, 3990 (1965)
- (98) E.M.Bradbury, L.Brown, A.R.Downie, A.Elliot, R.D.B. Fraser und W.E.Hanby: J.Mol.Biol. 5, 230 (1962)
- (99) E.M.Bradbury, B.G.Carpenter und R.M.Stephens: Biopolymers 6, 905 (1968)
- (100) K.J.Wen und R.W.Woody: Biopolymers 14, 1827 (1975)
- (101) K.Palm: Z.Chem. 7, 361 (1967)
- (102) E.J.Cohn und J.T.Edsall: " Proteins, Amino Acids, and Peptides as Ions and Dipolar Ions " Kap.20, Reinhold, New York 1943
- (103) H.Wolff, H.Müller und H.Müller: Ber.Bunsenges.physik. Chem. 78, 1241 (1974)

- [134] Y.N.Ozols and A.A.Ovsepian: Biopolymers 11, 2179 (1972)
- [135] G.D.Fasman in: "Poly- α -Amino-Acids", ed. G.D.Fasman S.512, Dekker, New York 1967
- [136] Arbeiten zitiert von B.Katzenberg, M.Veis, H.T.Salman und A.Berger in "The Proteins" Ed.H.Neurath, Bd.2, S.439,440 und 465, Academic Press, New York 1964
- [137] P.Combettes, C.Barriga-Larange and J.Lascombe: Biopolymers 13, 577 (1974)
- [138] A.Veis, E.Kaufmann und C.C.W.Chao in: "Conformation of Biopolymers", Ed. G.N.Ramachandran, Bd.2, Academic Press, New York 1967

Lebenslauf

Name: Rainald Lindemann

Geburtsdatum: 21. 7. 1944

Geburtsort: Göttingen

Staats-
angehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet

Eltern: Dr. Dietrich Lindemann, Tierarzt,
und Frau Gertrud, geb. Ewig

Schulbildung: 1950 - 54 Grundschule in Hamburg-Neuenfelde
1954 - 63 Gymnasium in Hamburg-Harburg,
altsprachlicher Zweig
1963 Abitur

Hochschule: 1963 - 68 Studium der Physik an der
Universität Hamburg
1968 - 71 Studium der Physik an der
Ludwig-Maximilians-Universität München
1971 Diplom in Physik
1971 - 75 Anfertigung der Dissertation am
Physikalisch-Chemischen Institut der
Universität München bei Prof. Dr. G. Zundel

